
**FENOTIPIZZAZIONE ED
ISOLAMENTO DI SEQUENZE
GENICHE PUTATIVAMENTE
COINVOLTE NELL'ASSORBIMENTO,
TRASLOCAZIONE ED ACCUMULO DI
METALLI IN POMODORO**

Silvia Maria Lippo

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – XXII ciclo
Indirizzo Biotechnologie per le Produzioni Vegetali
Università di Napoli Federico II





**FENOTIPIZZAZIONE ED
ISOLAMENTO DI SEQUENZE
GENICHE PUTATIVAMENTE
COINVOLTE NELL'ASSORBIMENTO,
TRASLOCAZIONE ED ACCUMULO DI
METALLI IN POMODORO**

Silvia Maria Lippo

Dottoranda: Silvia Maria Lippo

Relatore: Prof. Edgardo Filippone

Coordinatore: Prof. Ettore Benedetti

*Alla mia famiglia e
ai miei veri amici*

INDICE

RIASSUNTO	1
SUMMARY	3
1 INTRODUZIONE.....	6
2 SCOPI DELLA TESI	12
2 MATERIALI E METODI	13
2.1 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo <i>Solanum lycopersicum</i> cv M82 e del genotipo <i>Solanum lycopersicum</i> IL 6-4 allevate fuori suolo.....	13
2.1.1. Materiale Vegetale	13
2.1.2. Coltivazione in idroponica	13
2.1.3 Analisi statistica	14
2.2 Identificazione di sequenze di geni dell'omeostasi di metalli in pomodoro	14
2.2.1 Materiale vegetale.....	14
2.2.2 Estrazione del DNA genomico.....	14
2.2.3 Corsa elettroforetica e quantizzazione del DNA estratto	15
2.2.4 Disegno dei primer.....	15
2.2.5 Analisi di amplificazione di DNA genomico mediante pcr (polimerase chain reaction)	16
2.2.6 Purificazione del DNA dopo reazioni di pcr	16
2.2.7 Clonaggio delle sequenze isolate in plasmidi	17
2.2.8 Sequenziamento degli ampliconi.....	18
3 RISULTATI	20
3.1 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo <i>S. lycopersicum</i> cv M82 e del genotipo <i>S. lycopersicum</i> IL 6-4 allevate fuori suolo nella soluzione nutritiva di base	20
3.1.1 Analisi della crescita	20
3.1.2 Analisi dello ionoma	20
3.2 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro <i>Solanum lycopersicum</i> cv M82 allevate fuori suolo in presenza di varie concentrazioni di cadmio, piombo e zinco.....	20
3.2.1 Analisi della crescita	20
3.2.2 Analisi dello ionoma	20
3.3 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo <i>S. lycopersicum</i> cv M82 e del genotipo <i>S. lycopersicum</i> IL 6-4 allevate fuori suolo in presenza di cadmio 10µm, zinco 100µm e loro combinazione.....	21
3.3.1 Analisi della crescita	21
3.3.2 Analisi dello ionoma	21
3.4 Identificazione di sequenze di geni dell'omeostasi di metalli in pomodoro	23

4. DISCUSSIONI	26
5.CONCLUSIONE.....	36
6. TABELLE E FIGURE	37
7. BIBLIOGRAFIA.....	102
APPENDICE	108
COPIA DELLE PUBBLICAZIONI	109

RIASSUNTO

Con il termine “domesticazione” s’intende quel processo per cui una specie, vegetale o animale, viene trasferita da una situazione naturale ad una situazione che prevede il controllo e l’intervento da parte dell’uomo su alcune funzioni fisiologiche, in particolare nutrizione e riproduzione. Per una specie vegetale quindi, il processo di domesticazione può dirsi concluso quando questa non è più in grado di crescere in condizioni spontanee, ma solo se coltivata (Lorenzetti F. *et al.*, 1994).

Una delle metodologie per il miglioramento genetico delle piante coltivate è l’incrocio tra varietà coltivate e specie selvatiche. Ciò comporta l’introgressione nella specie coltivata, oltre che di caratteri richiesti dal mercato alimentare, anche di caratteri non desiderabili, tra cui l’accumulo di metalli tossici, come il piombo ed il cadmio, nelle parti eduli della pianta. Tale rischio deriva anche da una bassa specificità dei trasportatori di membrana deputati all’assorbimento di tali metalli, come ad esempio il cadmio e lo zinco che possono essere traslocati all’interno delle radici dalla stessa proteina.

Nell’ambito del progetto “GenoPom”, finanziato dal MIUR, in cui l’obiettivo finale è quello di ottenere una mappa ionomica del pomodoro, il presente lavoro si è occupato di determinare il profilo ionico in organi di pomodoro, sia in condizioni di coltura standard che in presenza di metalli forniti alla pianta in concentrazioni più elevate rispetto alla norma, ma non letali e di identificare nei genotipi di pomodoro coltivati e selvatici determinati geni coinvolti nei meccanismi di assorbimento, trasporto e accumulo di ioni metallici.

Per gli esperimenti sull’omeostasi ionica, piante di *Solanum lycopersicum* cv M82 e della linea d’introgressione IL 6-4 sono state coltivate in idroponica, o in substrato inerte costituito da perlite.

Differenze nello sviluppo tra la cv M82 di *S. lycopersicum* e la linea d’introgressione IL 6-4 sono probabilmente ascrivibili all’interazione tra il genoma della specie coltivata e la regione introgressa della specie selvatica .

Le analisi ioniche, ottenute con ICP-MS, mostrano che le caratteristiche correlate all’omeostasi ionica sono significativamente modificate in risposta ai diversi trattamenti differenziandosi in caso di trattamento singolo o multiplo, ed anche in relazione al genotipo analizzato: in idroponica la linea d’introgressione IL 6-4 accumula più ioni della cv M82, in presenza di Cd accumula meno Zn e Pb mentre in eccesso di Zn ne accumula di più nelle radici rispetto al parentale coltivato; in perlite nella cv M82 il Cd è traslocato nell’apice, il Pb si accumula nella radice, lo Zn è traslocato solo alle concentrazioni più elevate; infine nel triplo trattamento lo Zn si accumula in maniera statisticamente rilevante nella radice rispetto al trattamento singolo.

Per quanto riguarda l’approccio di genomica funzionale, studi bibliografici preliminari hanno permesso di individuare 25 geni maggiormente coinvolti nell’omeostasi dei metalli in pianta; di questi, 4 geni *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt*, sono presenti in almeno due specie vegetali differenti, ma non ancora clonati nel genere *Solanum*.

Analisi bioinformatiche hanno consentito d’individuare diverse sequenze EST di pomodoro che, assemblate in Uni Gene – rappresentanti cluster che teoricamente corrispondono ad un singolo gene – risultano avere un’alta percentuale d’identità con quelle ricercate per i geni *ysl*, *znt* e *mtp*. Al fine di verificarne l’effettiva presenza,

sono state disegnate coppie di primer su ciascun Uni Gene individuato, ed in seguito i frammenti ottenuti sono stati sequenziati e clonati .

Confrontando la sequenza nucleotidica di *ysl* ottenuta in questo modo con le altre presenti in banca dati, è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene *ysl1* di tabacco. La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta *in silico* e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

La sequenza nucleotidica di *znt1* ottenuta e clonata risulta avere invece un'identità del 96% con la sequenza codificante completa del gene *znt1* di *Chengiopanax sciadophylloides*, mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'identità del 79% con la corrispondente sequenza proteica.

Studi bibliografici sulla specie modello *Arabidopsis thaliana* hanno permesso di identificare 8 differenti geni denominati dalla sigla *hma* coinvolti nel trasporto di metalli; traducendone *in silico* una di esse è stata eseguita un'interrogazione in una banca dati del proteoma di pomodoro finora sequenziato al fine di ottenere dalla banca dati genomica SOL i BAC ed il contig su cui sono stati disegnate più coppie di primer. Dall'analisi elettroforetica dopo amplificazione *in vitro* si è notata la presenza di due ampliconi di circa 2.000 bp e di 650 bp per tutti i genotipi analizzati. Per quanto concerne il gene *ysl* è stato ottenuto un amplicone di circa 1200 nucleotidi su genomi di *S. lycopersicum* cv MoneyMaker, *S. lycopersicum* cv M82, e *S. lycopersicum* San Marzano selezione 6 corrispondente al gene atteso. Analogo procedimento è stato utilizzato per l'isolamento di un'altra sequenza del gene *ysl*, diversa da quella già isolata.

Le analisi *in silico* delle sequenze nucleotidiche del gene *hma* – ottenute per i cinque genotipi analizzati – e quelle del gene *ysl* – ottenute per tre dei cinque genotipi analizzati – hanno mostrato rispettivamente un'identità del 78% con la sequenza di *hma4* di *Arabidopsis thaliana* e un'identità del 72% con la sequenza di *ysl5* di *Arabidopsis thaliana*.

SUMMARY

'Domestication' is the term used for the process by which a vegetable or animal species is transferred from a natural situation to a situation which foresees man's control over some physiological function, such as nutrition and reproduction. So in a vegetable species, the process of domestication is finalized when the plant is no longer able to grow in a spontaneous way, it becomes only cultivated. (Lorenzetti F. et al., 1994)

One of the ways to improve the genetics of cultivated plants is to cross-fertilize them with wild varieties. This brings about the introgression to the cultivated species, besides the required characteristics of the food market, such as the accumulation of toxic metals, lead and cadmium in the edible parts of the plant. This risk results from the low specificity of the carrier membranes delegated to absorb these metals. For example cadmium and zinc which can be moved to the inside of the root of that same protein.

The aim of the project 'GenoPom', funded by MIUR, is to get an ionomic map of the tomato. The actual work is determining the ionic profile in tomato organs, both in standard cultivation and in conditions with the presence of metals. These metallic elements are supplied in elevated but not lethal doses, compared to the norm. Then, they are identified in the genotypes of the cultivated and wild tomatoes, also the genes involved in the absorption mechanism, the transport and accumulation of metallic ions.

Solanum lycopersicum cv M82 and the introgression line IL 6-4 were used for the experiments of the ionic homeostasis. They were cultivated in hydroponics or in an inert substratum made of pearl-stone.

The differences in the development of the cv M82 of the *S. lycopersicum* and the introgression line IL6-4 are probably due to the interaction between the genome of the cultivated species and the introgression region of the wild species.

The ionic analysis, obtained by ICP-MS show that the related characteristics of the ionic homeostasis are significantly modified as a result of the various treatments. The results are different in single and multiple treatments and also in relation to the genotype which is analyzed. In hydroponics the introgression line of IL6-4 accumulates more ions than the cv M82. With cadmium, it accumulates less zinc and lead, while in the excess of zinc, it accumulates more in the roots than in the cultivated example. In the pearl-stone case of cv M82 the cadmium moves to the apex, the lead accumulates in the root, the zinc moves only in the case of elevated doses. Finally in the third treatments, the zinc accumulates itself in a statistically prominent way in the root, when compared to the single treatment.

Regarding the practical approach of genomics, preliminary bibliographical studies have allowed 25 genes to be identified. These are the genes which are most involved in the homeostasis of the metals in plants; 4 of these *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt* are present in at least two different vegetable species, but they are still not cloned in the *Solanum* genus.

Bio-informatic analysis has allowed to characterize the different EST series of the tomato, which are assembled in Uni Gene. - portrayed as clusters which theoretically correspond to a single gene – prove to have a high percentage with those sought after for the genes *ysl*, *znt* and *mtp*. At the final check of their actual presence,

primer couples were outlined on each individual Uni Gene and the obtained fragments were sequenced and cloned.

The nucleoid sequence of *ysl* obtained in this way was compared to the others present in the data bank. A 92 % identity was checked to the complete sequence coding of the *ysl* gene in tobacco. The putative nucleotide sequence coding was expressed '*in silico*' and confronted with the amino acidic sequence in the data bank. The resulting identity was 89% with the amino acidic sequence of the *ysl* protein in tobacco.

Instead the nucleotide sequence of the obtained and cloned *znt1*, results in having a 96% identity to the complete sequence coding of the *znt1* gene of *Chengiopanax sciadopylloides*. The resulting amino acidic sequence has a 79% identity to the corresponding protein sequence.

Bibliographical studies on the species *Arabidopsis thaliana* have allowed 8 different genes to be identified. These genes, called by the abbreviation *hma*, are involved in the transport of metals. When transferred '*in silico*' one of them was tested in a data bank of the tomato proteoma. Until now this has been sequenced to obtain SOL I BAC from the genome data bank, and on which more primer couples have been outlined. From the elettrophoresis analysis, after the amplification '*in vitro*', the presence of 2 amplicons were noted. These were about 2,000 bp and 650 bp for all genotypes analyzed. Regarding the *ysl* gene, an amplicon of 1.200 nucleotides of the selection *S. lycopersicum* cv Money maker, *S. lycopersicum* cv M82, e *S. lycopersicum* San Marzano, selection 6 corresponding to the expected gene. A similar procedure was used to isolate another sequence of the *ysl* gene, which was different to the one already isolated.

The analysis of the nucleoid sequence of the *hma* gene '*in silico*', obtained from the 5 analyzed genomes and those of the *ysl* gene obtained from 3 of the 5 analyzed genomes have respectively a 78% identity with the *hma4* sequence of *Arabidopsis thaliana* and an identity of 72% with the sequence of *ysl5* of *Arabidopsis thaliana*.

1 INTRODUZIONE

L'addomesticazione da parte dell'uomo di specie selvatiche conduce ad un impoverimento della variabilità genetica, la quale viene ampliata con vari tipi di approcci genetici. Una delle metodologie per il miglioramento genetico di specie vegetali è l'incrocio sessuale tra specie appartenenti allo stesso genere oppure con incroci intragenerici. All'ottenimento di embrioni ibridi vitali è seguito un rimodellamento del genoma verso la specie coltivata utilizzando in molti casi una serie di reincroci con il parentale coltivato. La selezione degli individui ottenuti da tali incroci viene effettuata, nella maggior parte dei casi, con l'espressione dei fattori da migliorare come; la resistenza a stress biotici oppure abiotici, miglioramento della qualità e della quantità.

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è tra le piante agricole che negli ultimi anni è stata oggetto di numerosi incroci con specie selvatiche del genere *Solanum*, dovuto sia alla sua diffusione in tutto il mondo e quindi alla sua importanza economica e sia per gli usi di tipo diretto o per la trasformazione industriale.

Attualmente si ritiene che, oltre al pomodoro coltivato e la sua primitiva forma varietale cerasiforme, appartengano alla sottofamiglia delle *Solanoidae* altre otto specie selvatiche. Tutte le specie sono caratterizzate dalla stessa formula genomica $2n=2x=24$ e tutte provengono dall'America del sud, dove occupano una grande varietà di ambienti: dalle aree costiere ad elevata salinità (*S. cheesmanii*), alle aree aride (*S. pennellii* e *S. chilense*), alle zone umide, e persino ad altitudini superiori ai 3000 metri (alcune accessioni di *S. hirsutum* e *S. chilense*) (Taylor I.B., 1986). Tale variabilità di caratteristiche presenti nelle specie selvatiche di pomodoro ha indotto la produzione di linee definite d'introggressione derivate da un backcrossing tra l'ibrido F_1 e la varietà coltivata. Tali linee di introgressione sono soggette negli ultimi anni a differenti tipi di approcci genetici e biochimici.

I caratteri su cui, fin dal passato, si è incentrato il lavoro del miglioramento genetico, sono soprattutto *habitus* di crescita e peculiarità della bacca (taglia, forma, colore e morfologia); per quanto concerne le dimensioni del frutto, la variabilità è, ancora oggi, significativa: da taglie estremamente ridotte, che assolvevano il solo fine di propagare il seme, i *breeders* sono arrivati a costruire bacche di grandi dimensioni, che sono caratteristiche delle moderne cultivar di pomodoro e che risultano pienamente indicate per il consumo alimentare (Bai e Lindhout, 2007).

Con la domesticazione non si è avuta soltanto una variazione della taglia, ma anche della forma del frutto: dalle specie selvatiche con bacche prevalentemente tondeggianti, si è passati alle varietà moderne dalla bacca oblata, sferica, allungata o piriforme (Tanksley, 2004). Probabilmente, nel corso del lavoro di selezione per frutti grandi, si sono verificati cambiamenti anche nella forma che potrebbero essere attribuiti ad effetti pleiotropici da parte di loci associati alla taglia delle bacche, o alla manifestazione di geni che risultano repressi in background genetici più ristretti (Grandillo *et al.*, 1999).

L'introggressione di geni utili dalle specie selvatiche nella specie coltivata, è spesso accompagnata dal trasferimento di molti altri geni non desiderati, che non vengono eliminati dopo diverse generazioni di reincrocio. Inoltre, la natura poligenica della maggior parte dei caratteri d'interesse agronomico pone difficoltà aggiuntive all'introggressione di geni utili dal germoplasma selvatico. Un altro problema associato all'uso delle specie selvatiche è la difficoltà nell'identificare sulla base del solo

fenotipo le specie che possono contenere geni utili per caratteri quali produzione e qualità, controllando solo alcuni delle migliaia di caratteri putativamente trasferiti nella progenie da parte del genitore selvatico.

In un'ottica di sicurezza alimentare alcuni caratteri di rusticità, utili per le specie coltivate, sono spesso associati a caratteri negativi, quali l'assorbimento di metalli tossici dal suolo e la loro traslocazione negli organi eduli. Recentemente molta attenzione è stata diretta alla possibilità di utilizzare conoscenze di genomica funzionale per "fortificare" le specie vegetali d'interesse alimentare migliorandone le caratteristiche sia organolettiche che nutrizionali, al fine sia di arricchire i cibi, in fase di pre-raccolta, degli elementi minerali indispensabili per una dieta bilanciata sia di evitare che si abbiano accumuli di metalli, quali ad esempio il cadmio, tossici per la salute umana.

Il termine "metallo pesante" si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a 5 g/cm³ (Holleman A.F. *et al.*, 1985). I circa quaranta elementi che rientrano in questa categoria si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri (Riffardi R. *et al.*, 1989). In base a tali caratteristiche possono essere definiti metalli pesanti elementi chimici come piombo, cadmio e mercurio, questi diciannove metalli non sono essenziali per il metabolismo e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi pesanti quali ferro, rame, zinco, cobalto e manganese sono micronutrienti essenziali per il metabolismo; tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998a). Probabilmente, il termine metallo pesante è stato adottato in quanto evoca il concetto di tossicità e permanenza nei sistemi biologici, oltre che il lungo periodo di residenza o persistenza nell'ambiente che li caratterizza. La quasi totalità delle piante è in grado di accumulare metalli pesanti, quali Fe, Zn, Mn, Cu, indispensabili ai loro processi vitali. Certe piante possono accumulare anche altri tipi di ioni metallici, che apparentemente non svolgono una funzione biologica, ma che al contrario risultano notevolmente tossici per la maggior parte degli organismi viventi. L'inquinamento da metalli tossici di acque e suoli è aumentato notevolmente per effetto delle attività antropiche dovute principalmente a combustione d'idrocarburi fossili, attività minerarie, uso di fertilizzanti, pesticidi e rifiuti urbani. Per i metalli in fase gassosa, la deposizione può avvenire a distanze molto superiori, fino a 10.000 Km dalle fonti di emissione. I metalli in traccia immessi nell'ambiente, depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, sono soggetti a cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali (Zenk, 1996). I metalli pesanti, giunti al suolo direttamente con le particelle aerotrasportate e depositate in forma umida o secca, oppure indirettamente, tramite le acque meteoriche che dilavano gli inquinanti depositati sulla vegetazione, possono subire diversi processi quali adsorbimento, complessazione e precipitazione in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo (Aromolo *et al.*, 1999). L'analisi di diverse specie vegetali sia terrestri che acquatiche ha mostrato che esse bioaccumulano efficacemente metalli pesanti, in condizioni d'inquinamento. Molte piante, tra cui briofite, alghe e piante superiori, hanno evoluto la capacità di accumulare elementi in traccia a livelli superiori di quelli presenti nel suolo o nelle acque o anche rispetto a specie che crescono nella stessa area. Le briofite, per l'elevato rapporto superficie/volume e la presenza di una cuticola molto sottile,

accumulano efficacemente metalli pesanti. Esse, infatti, concentrano nei loro tessuti metalli pesanti in misura superiore rispetto all'ambiente e per tale motivo vengono utilizzate come bioindicatori dell'inquinamento ambientale (Brown, 1984; Tyler, 1990).

Le piante possiedono un efficace sistema di difesa intracellulare per chelare i metalli pesanti. Tale sistema è costituito dalle fitochelatine (PC), peptidi la cui massa molecolare si aggira intorno ai 2-3 KDa, costituiti da cisteina, acido glutammico, glicina o alanina. Le fitochelatine non sono sintetizzate sui ribosomi e non richiedono un mRNA: la loro struttura coinvolge il legame S-glutamyl-cisteinico che si forma per azione di ventidue un enzima detto fitochelatin-sintetasi (PC-sintetasi). La sintesi delle fitochelatine è indotta nel momento in cui la pianta è esposta all'azione dei metalli pesanti. Tale induzione non si esercita a livello genetico come nel caso delle metallotioneine, ma a livello metabolico: gli ioni dei metalli pesanti attivano l'enzima PC-sintetasi, promuovendo un processo di polimerizzazione che porta alla formazione di molecole di PC che possono comprendere da 2 a 11 unità glutamylcisteiniche (Zenk, 1996). Il meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: assorbimento a livello radicale, trasporto dei metalli all'interno della pianta, meccanismi di detossificazione (Salt *et al.*, 1995a). Spesso la maggior parte dei metalli nel suolo è legata ai suoi costituenti, per cui, affinché le piante possano accumularli, è necessario che questi elementi vengano resi solubili. La mobilitazione dei metalli legati al suolo può avvenire in diverso modo: molte piante rilasciano, attraverso le radici, delle specifiche molecole (fitosiderofori) che hanno la capacità di chelare e solubilizzare i metalli pesanti (un esempio può essere l'acido avenico delle graminacee). Altre piante sono in grado di ridurre e conseguentemente mobilitare gli ioni metallici, grazie all'intervento di specifici riducenti metallici legati alla membrana plasmatica delle cellule radicali. Analizzando delle piante di pisello si è notato, infatti, che individui carenti di nutrienti quali Fe e Cu manifestavano una maggiore capacità a ridurre il Fe (+3) e il Cu (+2); e parallelamente si assisteva ad un incremento nell'assorbimento di elementi quali Fe, Cu, Mn, Mg. Un'ulteriore modalità di solubilizzazione dei metalli pesanti può essere dovuta all'acidificazione del terreno grazie al rilascio di protoni dalle radici: un basso pH rilascia in soluzione gli ioni metallici. Una volta solubilizzati questi ioni possono entrare nelle radici o per via apoplastica (extracellulare) o per via simplastica (intracellulare); molti metalli entrano nelle cellule vegetali grazie ad un trasporto attivo mediato da carriers o canali specifici. Dalle radici gli ioni metallici possono passare al germoglio mediante i vasi xilematici e, successivamente, essere distribuiti al resto della pianta per mezzo del floema. Per poter giungere allo xilema questi ioni devono necessariamente attraversare l'endoderme che grazie alla banda del Caspary consente il trasporto simplastico, essendo la via apoplastica bloccata. Le piante che accumulano metalli pesanti devono poter resistere ai loro effetti tossici; ciò si realizza o limitando l'assorbimento dei metalli a livello cellulare, o detossificando il metallo entrato, oppure sviluppando un meccanismo biochimico che sia in grado di renderle resistenti. Molte piante posseggono specifici enzimi per la resistenza ai metalli pesanti, per esempio, le fosfatasi acide della parete cellulare. Una volta penetrati nelle cellule, i metalli devono essere detossificati e questo può avvenire per chelazione, per precipitazione o per compartimentalizzazione. Per esempio, lo Zn può essere chelato da acidi organici ed accumularsi nel vacuolo, o essere precipitato sotto forma di Zn-fitato. Anche il cadmio è accumulato nel vacuolo, dove risulta associato a fitochelatine. Il vacuolo nella pianta può svolgere anche una funzione di

difesa. Nel momento in cui la pianta si trova a contatto con i metalli pesanti, sono accumulati nel vacuolo dei peptidi a base di glutatione, le fitochelatine, che legano il metallo. Il glutatione stesso, legandosi a numerosi composti potenzialmente tossici (mediante il residuo di cisteina; enzima glutatione S-trasferasi, GST), contribuisce a rimuoverli dal citoplasma trasportandoli nel vacuolo.

Alla presenza degli stessi elementi e nelle stesse condizioni ambientali, le piante possono mostrare tre differenti tipi di comportamento, per cui possono essere classificate in:

1) “excluders”, piante che hanno sviluppato il meccanismo di “avoidance” (controllo dello stress), che consiste nel prevenire l’assorbimento e la traslocazione degli ioni metallici;

2) “indicators”, che assorbono ed accumulano metalli tramite meccanismi come la chelazione, localizzazione ed inattivazione chimica, che ne riducono l’effetto tossico; esse sono utili per il biomonitoraggio in quanto la concentrazione dei metalli nei tessuti riflette la loro disponibilità ambientale;

3) “accumulators”, che tollerano e possono accumulare elevate concentrazioni di metalli nei propri tessuti, spesso indipendentemente dal significato fisiologico o dal livello ambientale di tali metalli (Bargagli, 1998b).

Da quanto detto, si evince che la risposta delle piante allo stress causato dalla tossicità dei metalli risulta molto diversificata, dipendendo, in parte, anche dalla variabilità individuale. I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli, dunque, sono riconducibili a due tipi essenziali di strategia che consistono nel tollerare (indicators e accumulators) o nell’evitare lo stress (excluders), (Marchionni, 1999). Il concetto di metallo-esclusione ed i meccanismi di protezione contro l’assorbimento e la traslocazione dei metalli non sono ancora ben chiari; si ritiene che la maggior parte delle piante “excluders” prevenga l’assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o nelle micorrize. Tali piante riescono, così, a mantenere piuttosto costante la composizione elementare dei loro tessuti interni ed a prevenire eventuali effetti tossici degli inquinanti. (Bargagli, 1998a; Arduini *et al.*, 1996). La relazione simbolica stabilita con i funghi micorrizici rappresenta un valido meccanismo di difesa di tali specie (Marchionni, 1999). Nelle piante “tolleranti”, sono stati sviluppati, a livello cellulare, diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro a livello della parete cellulare, la presenza di membrane metallo tolleranti e di pompe che trasportano attivamente i metalli all’esterno della cellula, la detossificazione enzimatica, la compartimentalizzazione, la riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici (Bruins, 2000). La protezione della pianta contro gli effetti tossici dei metalli è assicurata, in primo luogo, dal controllo dell’assorbimento radicale e del trasporto a lunga distanza dei metalli (Briat and Lebrun, 1999). Le radici agiscono come una barriera che limita la traslocazione dei metalli verso il germoglio; la sua capacità di accumulo, tuttavia, varia secondo la specie. Per esempio, rispetto al cadmio le piante di pomodoro risultano più tolleranti delle piante di fagiolo, in quanto il loro sistema radicale è più efficiente nell’accumulare il cadmio (Leita *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 1992; Obata H. *et al.*, 1993; Salt *et al.*, 1995b); in tal modo, nel sistema radicale si accumula la maggior quantità di metalli, mentre fusto, foglie, frutti e semi ne contengono quantità progressivamente minori. Tuttavia, l’assorbimento di metalli attraverso le foglie può diventare notevole nel caso d’inquinanti atmosferici che le raggiungono

direttamente attraverso le deposizioni atmosferiche (Bargagli, 1998a). In particolare, una delle ragioni dell'elevata metallo-tolleranza di alcune specie è data dalla capacità di accumulare metalli, soprattutto a livello cellulare, senza permettere ai metalli di penetrare all'interno del protoplasto, che è maggiormente sensibile all'azione tossica dei metalli. Le 28 cellule radicali a diretto contatto con le soluzioni circolanti nel suolo, sono esposte agli ioni tossici che possono danneggiare la membrana cellulare causando la perdita di potassio dalla cellula, o l'inibizione dell'attività degli enzimi superficiali (Carballeira *et al.*, 1999). In questo caso, un efficiente meccanismo di resistenza contro i metalli ad attività redox è rappresentato da modificazioni strutturali nella membrana plasmatica tali da renderla meno vulnerabile alla perdita di nutrienti o all'inibizione enzimatica (Wainwright S.J. *et al.*, 1975). A livello intracellulare, le piante metallo tolleranti possono adottare varie strategie per limitare l'azione tossica di quei metalli che, superando l'ostacolo della parete e della membrana cellulare, riescono a penetrare all'interno della cellula. La metallodetossificazione all'interno delle cellule si può realizzare anche attraverso il legame con specifici ligandi organici, in questo modo si ha la formazione di complessi metallici non dannosi per la cellula. Ad esempio, sia nelle specie sensibili, sia in quelle metallo-tolleranti, il maggior apporto di alcuni metalli, il cadmio in particolare, può indurre la produzione di peptidi metallo-chelanti, ricchi di residui cisteinici, generalmente definiti fitochelatine. Molti ricercatori hanno ipotizzato che le PCs sono direttamente coinvolte nel controllo omeostatico degli ioni metallici all'interno della cellula vegetale. Un ulteriore meccanismo di metallo-resistenza è rappresentato dall'accumulo preferenziale dei metalli in organi senescenti, per esempio le foglie, in modo che, con l'abscissione di tali organi, si ottenga anche la rimozione dell'eccesso di metalli dalla pianta (Bargagli, 1998a). La metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva (determinata geneticamente), indotta (in seguito all'esposizione preventiva a metalli pesanti), oppure di natura mista, in quanto risulta determinata geneticamente, ma il suo grado di espressione dipende dalle condizioni ambientali. La metallo-tolleranza costitutiva è stabile e non influenzabile dalle condizioni ambientali, mentre la metallo-tolleranza indotta, essendo una forma di acclimatazione all'ambiente (Okland *et al.*, 1997), persiste finché sussistono gli specifici fattori di stress che ne hanno determinato l'insorgenza (Rout *et al.*, 2000).

Negli ultimi anni diversi studi hanno permesso di comprendere sempre più nel dettaglio i meccanismi di assorbimento di traslocazione e accumulo dei metalli in pianta. I metalli di transizione, come rame, zinco, ferro o manganese, sono essenziali per la normale crescita e per lo sviluppo delle piante. Tali elementi devono essere assorbiti dal suolo, distribuiti nella pianta che ne regola la concentrazione nei differenti tessuti, cellule e organelli. L'omeostasi dei metalli nei vari organi vegetali è essenzialmente regolata dall'espressione di diverse famiglie geniche codificanti trasportatori. I trasportatori di membrana giocano un ruolo centrale in queste differenti attività (**Fig.1.1**), tanto che negli ultimi anni sono moltiplicati gli studi su questa tipologia di proteine (Hall J.L., 2003). Infatti, sono state identificate diverse famiglie geniche che mostrano la capacità di svolgere queste funzioni nella regolazione e nell'omeostasi dei metalli in pianta (**Tab.1.1**).

Tali trasportatori possono essere suddivisi in "metal uptake protein" e "metal efflux protein", responsabili, rispettivamente dell'assorbimento dal suolo e del movimento intercellulare dei differenti elementi minerali nella pianta. (Colangelo E.P. *et al.*, 2006). Generalmente tali famiglie sono composte di un elevato numero di membri, ad

esempio in *Arabidopsis* sono stati identificati e caratterizzati otto differenti geni *hma* (heavy metal ATPase), sei *nramp* (natural-resistance associated macrophage protein) e quindici *zip* (ZRT-IRT protein). Tale variabilità può essere richiesta per diverse ragioni; per compensare l'alta o bassa affinità della pianta nei confronti dei metalli a diversa disponibilità nel suolo; per rispondere alla differente domanda e alle specifiche necessità di tali elementi nei diversi tessuti della pianta; per rispondere a differenti situazioni di stress.

Naturalmente alcuni membri di queste famiglie geniche sono ridondanti. Le nuove conoscenze sui trasportatori di metalli sono dovute alla possibilità di utilizzare tali geni per la modificazione genetica di alcune specie sia per migliorare la qualità degli alimenti sia per la nutrizione umana che animale, sia per lo sviluppo di nuove tecniche di fitorisanamento per rimuovere dal suolo elementi tossici.

In pomodoro studi di genomica strutturale e funzionale hanno permesso ad esempio di individuare diversi geni responsabili per l'accumulo e la traslocazione del ferro nella pianta. Sono stati così caratterizzati i geni *irt1*, *nramp1* (Bereczky J., 2003) e *irt2* (Eckhardt, 2003), in quanto responsabili dell'assorbimento (*irt1* e *irt2*) e della traslocazione del ferro nei tessuti radicali. Tali evidenze sono risultate da analisi dei livelli di espressione di tali geni, in condizioni controllate e in condizioni di stress (sia da carenza che da eccesso di ferro nella soluzione nutritiva), e dall'espressione di tali proteine in lievito tramite trasformazione eterologa di *S. cerevisiae*. Per tali geni è stata inoltre dimostrata che c'è microsintenia con il genoma di *Arabidopsis thaliana*. D'altro canto, in pomodoro, a tutt'oggi non sono stati ancora investigati i processi di omeostasi per altri metalli.

2 SCOPI DELLA TESI

Attualmente, presso il Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e dell'Ambiente (DiSSPA) dell'Università Federico II di Napoli, sono disponibili 76 linee d'introgressione della specie selvatica *S. pennellii* acc. LA716) in *S. lycopersicum* (cv. M82) (Eshed Y. *et al.*, 1995) impiegate negli studi di genetica dei caratteri agronomicamente utili trasferiti dalla specie selvatica a quella coltivata.

A tutt'oggi l'apporto del genoma di *S. pennellii* nella costituzione di varietà di pomodoro per la biofortificazione e la sicurezza alimentare non è conosciuto. Tali linee d'introgressione sono quindi un materiale adatto per lo studio della traslocazione e accumulo nei vari organi vegetali sia dei metalli utili sia dannosi alla salute umana. Inoltre, possono essere utilizzati anche per lo studio d'interazione di espressione di geni putativamente legati all'assorbimento e/o traslocazione di tali metalli sia nei genomi parentali che in quelli ricombinanti.

Lo scopo ultimo è quello di contribuire alla costruzione di una mappa ionomica, ottenuta dall'unione dello ionoma e del genoma. del pomodoro utile per interventi mirati sugli ecotipi attuali nell'ambito del progetto "GenoPOM" – progetto finanziato dal MIUR e che s'interessa di produrre bacche di pomodoro qualitativamente superiori per caratteristiche fisiche e nutrizionali. La costituzione di una mappa ionomica presuppone la conoscenza delle due componenti che a tutt'oggi non sono disponibili in pomodoro. A tale scopo, gli obiettivi del presente lavoro di tesi sono stati:

1. l'analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro;
2. l'identificazione di sequenze di geni dell'omeostasi di metalli in pomodoro.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo *Solanum lycopersicum* cv M82 e del genotipo *Solanum lycopersicum* IL 6-4 allevate fuori suolo

2.1.1. Materiale Vegetale

Come fonte di DNA e per le analisi degli elementi minerali sono state utilizzate piante di pomodoro dei seguenti genotipi: *Solanum lycopersicum* cv M82, e la linea d'introgressione *Solanum lycopersicum* IL 6-4 allevate *in vivo*, in camera di crescita ad una temperatura giornaliera di 24°C e notturna di 20°C. Le piante sono state irrigate 2 volte a settimana con volumi costanti di, di soluzione nutritiva.

2.1.2. Coltivazione in idroponica

2.1.2.a Coltivazione idroponica su substrato inerte

Semi di pomodoro *S. lycopersicum* cv M82 sono stati sciacquati abbondantemente con acqua milliQ, sterilizzati in ipoclorito di sodio (NaClO) al 3% per 30 minuti e posti in acqua milliQ sterile per 24 ore. Successivamente i semi sono stati posti a germinare al buio su carta Whatman 3MM, in piastre Petri sterili, per 10 giorni, fino all'emergenza della radichetta. A tale stadio di maturazione le plantule sono state trasferite in vasetti contenenti perlite sterile (**Fig.2.1**) in cui è stata somministrata la soluzione nutritiva descritta in **Tab. 2.1** (Dong J. *et al.*, 2006)

Le piante sono state allevate in camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (26°C/18°C), fotoperiodo (18h luce/6h buio), irradianza (300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ed umidità (60%), quest'ultima ottenuta mediante evaporazione libera di acqua deionizzata posta in appositi contenitori (**Fig.2.2**).

Dopo 30 giorni di crescita dalla semina (**Fig.2.3**), stadio in cui le piante avevano completamente sviluppato la sesta foglia,

Si è proceduto nel seguente modo: in un litro e mezzo di soluzione nutritiva sono state addizionate le quantità di sali riportate in **Tab. 2.2** secondo il protocollo sperimentale mostrato nella **Tab. 2.3**

Dopo due settimane di trattamento su piante controllo e trattate si è proceduto al prelievo dei campioni da analizzare, effettuato direttamente in camera di crescita per evitare la mobilitazione ionica successiva a modifiche ambientali. In **Fig.2.4** e **2.5** sono mostrate le piante subito prima del prelievo dopo 55 giorni di allevamento. Al momento del prelievo si è determinata la biomassa dei singoli organi delle piante. Sono state prelevate le foglie del secondo palco dall'alto (foglie apicali), le foglie del penultimo palco dal basso (foglie basali) e le radici. I campioni sono stati quindi congelati in N₂ liquido e conservati a -80° C per le successive analisi.

La preparazione del materiale vegetale per l'analisi degli ioni mediante ICP-MS (Hansen T.H. *et al.*, (2009), ha previsto la loro essiccazione in un termostato settato a 70° C 72h, la successiva digestione in HNO₃ al 65 % di grado ultrapuro e H₂O₂ al 30% con dissoluzione in un sistema a microonde ad alta pressione (Multiwave Anton Paar).

La concentrazione degli elementi minerali è stata effettuata mediante l'ICP-MS Elan 6000 Perkin Elmer equipaggiato con un nebulizzatore a flusso perpendicolare,

presso il gruppo di ricerca dell'ENEA - Portici. Il metodo di digestione e la validazione dello strumento sono state effettuate usando due tipi di materiale vegetale di riferimento certificati (CRM): foglie di Orchard NBS 1571 e foglie di tabacco CTA-OTL-1.

2.1.2.b Coltivazione in soluzione nutritiva senza substrato inerte

Semi di pomodoro *S. lycopersicum* cv M82 e di *Solanum lycopersicum* IL 6-4 sono stati sterilizzati, posti a germinare, trasferiti in vaschette contenenti perlite sterile e la soluzione nutritiva descritta in precedenza (Dong *et al.*, 2006), secondo la metodica descritta nel paragrafo 2.1. Nelle Fig. 2.6, 2.7, 2.8 sono mostrati vari stadi di crescita delle plantule.

Dopo 5 settimane dalla germinazione le plantule sono state trasferite in vasetti allestiti ed adattati per coltura idroponica, utilizzando poliuretano espanso morbido come supporto in soluzione nutritiva completa (**Fig. 2.9 e 2.10**). Le piante sono state allevate in camera di crescita nelle stesse condizioni descritte in precedenza. (**Fig. 2.11 e 2.12**)

Dopo 30 giorni dalla semina le piante sono state trattate con soluzioni nutritive contenenti metalli secondo lo schema mostrato in **Tab. 2.4**.

Dopo 45 giorni di crescita nelle condizioni descritte si è proceduto al prelievo dei campioni da analizzare. Al momento del prelievo (**Fig. 2.13**) si è determinata la biomassa dei singoli organi delle piante. Sono state prelevate le foglie del secondo palco dall'alto (foglie apicali), le foglie del penultimo palco dal basso (foglie basali) e le radici. I campioni sono stati quindi congelati in N₂ liquido e conservati a -80° C per le successive analisi. La preparazione del materiale vegetale per l'analisi degli ioni mediante ICP-MS è avvenuta secondo la metodica nel paragrafo precedente.

2.1.3 Analisi statistica

L'analisi statistica dei livelli di concentrazione di metalli è stata effettuata mediante ANOVA. I confronti tra le diverse concentrazioni di metalli nei differenti organi stati condotti utilizzando LSD con una soglia di significatività per $p < 0.05$. Il programma utilizzato è Systat 5.2.1, mediante il T-test.

2.2 Identificazione di sequenze di geni dell'omeostasi di metalli in pomodoro

2.2.1 Materiale vegetale

Come fonte di DNA le specie vegetali utilizzate sono state piante di pomodoro dei seguenti genotipi: *Solanum lycopersicum* cv M82, la cv Money Maker, l'ecotipo San Marzano, selezione 6, *Solanum pennellii*, *Solanum habrocaites* allevate *in vivo*. Inoltre sono stati utilizzati DNA di altre specie vegetali (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Cicer arietinum*, *Phalaris canariensis*).

2.2.2 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata secondo il protocollo descritto nel manuale d'istruzioni del DNeasy ®Plant Mini Kit (Quiagen).

2.2.3 Corsa elettroforetica e quantizzazione del DNA estratto

La valutazione qualitativa del DNA estratto è stata fatta utilizzando gel di agarosio all'1%, mentre quella quantitativa utilizzando: *NanoDrop®* ND-1000 *spectrophotometer*.

2.2.4 Disegno dei primer

I primer utilizzati in reazioni di analisi di amplificazione PCR su DNA genomico sono stati disegnati con tre diversi approcci bioinformatici.

Il primo tipo di approccio utilizzato è stato l'individuazione nella Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) di sequenze di geni per il trasporto di metalli già clonati in specie vegetali diverse dal pomodoro e altamente omologhi ai geni d'interesse riportati nella **Tab. 2.5**

Per il trasporto del ferro i geni scelti da analizzare sono stati *ysl* (yellow stripe like protein) e *nramp* (natural resistance-associated macrophage protein), mentre per lo zinco e il cadmio sono stati *znt* (zinc transporter), *hma* (heavy metal transporter) e *mtp* (metal transporter protein). Grazie al programma <http://www.es.embnet.org/Services/MolBio/t-coffee/> le sequenze di questi geni sono stati allineate ed è stato possibile trovare le zone altamente conservate presenti in esse. Su tali zone sono stati disegnati i primer riportati in **Tab. 2.6** e usati nelle analisi molecolari.

Per il secondo approccio è stata utilizzata la banca dati di EST della SGN (Solanaceae Genomic Network, <http://www.sgn.cornell.edu/>) al fine di verificare l'eventuale presenza di sequenze altamente espresse, simili ai geni ricercati.

In questo modo, utilizzando di volta in volta le sequenze ottenute, per molti allineamento, è stato possibile identificare diversi EST con un'alta percentuale d'identità per geni *ysl*, *znt* e *mtp* in pomodoro; tali sequenze confermano la presenza in pomodoro dei geni ricercati. Gli EST ottenuti sono stati in seguito organizzati in Uni Gene, sovrapponendo tra di loro gli EST di ogni gene cercato, in modo da ottenere un'unica sequenza nucleotidica rappresentante l'mRNA completo di ciascun gene. In tal modo è stato possibile disegnare nuovi primer maggiormente specifici per i geni individuati (**Tab. 2.6**).

Per quanto concerne, invece, il terzo tipo di approccio è stata effettuata un'accurata ricerca bibliografica nella banca dati NCBI andando ad identificare quali membri delle famiglie geniche "*ysl*" e "*hma*" e erano stati già studiati e caratterizzati per la funzione di trasporto di metalli. Sono state identificate, allora, le sequenze proteiche relative a questi geni. Per ciascuno dei due geni è stata scelta una di queste sequenze (la più studiata) ed è stata confrontata in banca dati di pomodoro al fine di isolare le sequenze che avevano un'identità maggiore o uguale del 70% con essa, sono stati individuati i domini funzionali proteici e da essi è stata ricavata la sequenza nucleotidica. Si è poi provveduto ad individuare la posizione di tali sequenze sui BAC di pomodoro e, più specificamente, i contig relativi (cloneC02HBa0165K22, contig 24 del cromosoma 2 per il gene *ysl*, clone 45, contigC08HBa0251H04 del cromosoma 8 per il gene *hma*) sul quale sono stati disegnati i primer (**Tab.2.6**).

2.2.5 Analisi di amplificazione di DNA genomico mediante pcr (polimerase chain reaction)

I primer utilizzati sono quelli riportati nella **Tab. 2.6**. Nella miscela di reazione oltre ad essere presenti i due primer specifici sono presenti: il DNA delle specie vegetali in esame, che funge da stampo, una Taq polimerasi e il suo buffer specifico, $MgCl_2$, che attiva la Taq polimerasi e stabilizza le interazioni tra oligonucleotidi e stampo ed i dNTPs (deossiribonucleotidi fosfato) che costituiscono i precursori per la sintesi del DNA. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando 1 μ l di ciascun primer alla concentrazione di 10 μ M, 1 μ l di dNTPs alla concentrazione di 10 mM, 2,5 μ l di tampone della Taq polimerasi 10X (Invitrogen), 0,5 μ l di Taq polimerasi (Invitrogen) alla concentrazione di 5U μ l⁻¹, 1 μ l di $MgCl_2$ alla concentrazione di 50 mM, 25 ng di DNA ed H₂O fino ad un volume totale di reazione pari a 25 μ l.

La reazione di PCR è stata effettuata in un termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Le condizioni di reazioni sono state denaturazione iniziale di 5 minuti a 94°C, seguita da 25 cicli ognuno dei quali è fatto da una denaturazione iniziale di 15 secondi a 94°C, una fase d'ibridazione tra DNA stampo e primer lunga 30 secondi la cui temperatura dipende dalla temperatura alla quale funzionano i primer (melting) sottratta di 5°C ed infine da una fase di estensione di 1,5 minuti a 72°C. I 25 cicli sono stati seguiti da un ciclo di estensione finale di 10 minuti a 72°C ed i campioni sono stati conservati a -20°C.

Nella maggior parte dei casi più cicli di amplificazione sono stati necessari per amplificare le sequenze geniche dei geni *znt*, *ysl*, *hma*, *nramp* e *mtp* ed avere quantità adeguate di ampliconi per la successiva clonazione. Per ogni reazione sono stati preparati corrispondenti controlli negativi (eliminando il DNA stampo) e positivi (usando un DNA stampo o degli oligonucleotidi già usati in precedenza).

Solitamente 1/10 dei prodotti di reazione viene sottoposta a elettroforesi su gel di agarosio all'1% insieme con un marcatore di lunghezza per stimare la dimensione del frammento amplificato e valutarne la purezza, oltre che per valutare la specificità della condizione di reazione, o eventuali contaminazioni dei reagenti.

2.2.6 Purificazione del DNA dopo reazioni di pcr

I prodotti della PCR e della RT-PCR sono stati isolati utilizzando il kit di purificazione fornito dalla Promega PCR (Wizard ® SV Gel e PCR - Clean Up System). Esso si basa sulle proprietà di una resina a scambio ionico: in condizioni di elevata forza ionica il DNA si lega alla resina, mentre i contaminanti passano attraverso la colonna.

Le impurità vengono efficientemente lavate via, mentre il DNA purificato viene fluito in acqua o in tampone Tris. La composizione dei tamponi presenti nel kit è ottimizzata per un efficiente recupero del DNA e per la rimozione di contaminanti.

Per la purificazione è stato seguito il protocollo fornito assieme al kit dalla casa produttrice. La purezza dei frammenti amplificati è stata esaminata mediante elettroforesi di un'aliquota su gel di agarosio all'1% .

Per la quantizzazione del DNA estratto la concentrazione e la purezza estratto, sono state verificate utilizzando il *NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer* .

2.2.7 Clonaggio delle sequenze isolate in plasmidi

I frammenti amplificati e purificati sono stati clonati nel vettore di clonaggio pGEM-T Easy® (Promega) (**Fig.2.14**) e poi trasferiti nella specie batterica *Escherichia coli*.

Il clonaggio ha previsto le fasi di adenilazione degli amplificati, ligazione degli amplificati in vettori di clonaggio e inserimento dei vettori nelle cellule batteriche.

Nella fase di adenilazione degli amplificati, questi ultimi sono stati adenilati utilizzando una polimerasi che lega deossadenosina-monofosfato al 3'-OH indipendentemente dallo stampo. Per ogni frammento la quantità da adenilare, e quindi successivamente da ligare nel vettore di clonaggio, è stata calcolata in base alla relazione seguente:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vettore} \times (\text{paia di basi dell'inserto} / \text{paia di basi del vettore}) \times 3$$

tenendo conto che i protocolli della ditta Promega consigliano di utilizzare 50ng di vettore in ogni reazione di legazione.

La reazione è stata eseguita in un volume di 10µl. Nella miscela di reazione oltre all'amplificato sono presenti i dATP alla concentrazione di 2,5 mM, la Taq polimerasi (Promega) alla concentrazione di 5U µl⁻¹ ed il suo tampone alla concentrazione 1X (Promega) e MgCl₂ alla concentrazione di 5mM.

La miscela di reazione è stata posta a 70°C per 30 minuti nel termocicizzatore "Mastercycler Eppendorf ep gradient (Eppendorf USA)".

Alla fase di adenilazione ha fatto seguito quella di ligazione.

La reazione di ligazione consente di saldare le estremità di un plasmide a quelle di un frammento lineare di DNA grazie all'attività dell'enzima DNA ligasi, rendendo così possibile il clonaggio dei frammenti di DNA all'interno di vettori plasmidici.

Nel nostro caso ogni reazione di ligazione è stata allestita aggiungendo alla miscela di adenilazione i seguenti reagenti:

- 1µl di T4 DNA ligasi (Promega) 3U µl⁻¹
- 2µl T4 DNA Ligasi Buffer 10X
- 1µl pGEM-T-Easy (Promega) 50ng µl⁻¹
- H₂O fino ad un volume finale di reazione pari a 20µl

La miscela è stata incubata a 4°C per una notte.

Una miscela di reazione priva dell'inserto è stata inoltre utilizzata come controllo per valutare la capacità del vettore di richiudersi su se stesso.

L'ultima fase è stata quella d'inserimento del plasmide ricombinante in cellule batteriche. Il plasmide ricombinante è stato trasferito in cellule competenti di *Escherichia coli*, ceppo DH5a, preparate secondo il metodo del CaCl₂ descritto da Sambrook (Sambrook, *et al.*, 1989).

Per la trasformazione, 100µl di cellule batteriche competenti sono state miscelate a 5µl di DNA plasmidico. La miscela è stata posta in ghiaccio per 45 minuti, poi a 42°C per 90 secondi in un bagno termostato. Trascorso questo tempo è stata posta

di nuovo in ghiaccio per 10 minuti. Ad essa sono stati aggiunti 800µl di LB sterile ed è stata posta in agitazione a 37°C per un'ora. La soluzione è stata centrifugata per 30 secondi alla velocità di 13.200 rotazioni per minuto in una centrifuga da banco; ciò ha consentito di eliminare gran parte del surnatante e risospendere il pellet nel surnatante residuo.

La miscela è stata dispensata omogeneamente in capsule di Petri sterili su LB, gelificato con agar, contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l⁻¹. Su tale mezzo erano stati previamente dispensati 10µl di Isopropil-D-1-thiogalactopiranoside (IPTG) alla concentrazione di 200 ng µl⁻¹ e 100µl di 5-Br-4-Cl-3-indolo-galactopiranoside (X-Gal) alla concentrazione di 20ng µl⁻¹. Le capsule Petri sono state incubate a 37°C per una notte. La presenza di colonie sul mezzo LB, reso selettivo per la presenza dell'ampicillina, ha indicato che i batteri da cui tali colonie derivavano erano sopravvissuti grazie al gene marcatore presente nel plasmide.

La selezione delle colonie è stata eseguita con il metodo della distinzione blu - bianco: nel plasmide è infatti presente il gene *lacZ* che codifica per la β-galattosidasi, un enzima che scinde la molecola di X-Gal in due molecole di cui una è di colore blu. L'IPTG agisce sul promotore del gene inducendo la sintesi della β-galattosidasi.

Durante il clonaggio il frammento si inserisce nella regione *lacZ* impedendo la sintesi dell'enzima. Le cellule che contengono l'inserito non sono in grado di scindere X-Gal presente nel substrato, quindi saranno di colore bianco; mentre quelle prive dell'inserito metabolizzano X-gal colorandosi di blu. Le colonie bianche sono state inoculate in 1ml di LB liquido contenente ampicillina alla concentrazione di 100 mg l⁻¹ e lasciate crescere a 37°C per una notte in agitazione (Sambrook *et al.*, 1989).

E' stata eseguita un'analisi di PCR su colonia, con primer specifici, per confermare la presenza dell'amplicone all'interno del plasmide contenuto dalla colonia.

2.2.8 Sequenziamento degli ampliconi

E' stato utilizzato il kit Wizard ® Plus SV Minipreps DNA purification System della Promega per purificare il DNA plasmidico delle colonie batteriche risultate positive all'amplificazione.

I plasmidi ricombinanti, contenenti quindi ognuno uno dei frammenti d'interesse, sono stati isolati dai batteri e impiegati per la reazione di sequenziamento dell'inserito. Il sequenziamento è stato affidato alla ditta GeneLab di Santa Maria di Galeria (Roma), alla quale sono stati inviati i campioni del DNA plasmidico e le sequenze dei primer utilizzati nella fase di amplificazione.

Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati privati delle porzioni di sequenza del vettore fiancheggianti il sito d'inserzione, ciò ha consentito di individuare la sequenza dell'inserito.

Il sequenziamento degli ampliconi ottenuti per reazione PCR è stato invece affidato alla piattaforma GENOPOM presso il CNR di Portici: i campioni sono stati inviati dopo essere stati amplificati e purificati secondo il protocollo descritto nel paragrafo 2.2.6.

Le sequenze degli inserti sono state poi sottoposte ad analisi *in silico* utilizzando il programma BLAST (<http://130.14.29.110/BLAST/>) che ha confrontato tali sequenze

con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati GenBank del National Center for Biotechnological Information.

3 RISULTATI

3.1 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo *S. lycopersicum* cv M82 e del genotipo *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate fuori suolo nella soluzione nutritiva di base .

3.1.1 Analisi della crescita

Come riportato in [Tab. 3.1](#) i sistemi di allevamento fuori suolo non hanno influito in maniera statisticamente rilevante sul peso fresco della parte aerea (LSFW) e delle radici (RFW) di piante *S. lycopersicum* M82.

L'analisi dei dati di crescita di tali piante allevate in idroponica alla presenza della soluzione nutritiva di base, valutata come peso fresco delle piante, della parte aerea e delle radici, ha mostrato differenze significative in quanto la parte aerea del genotipo IL 6-4 cresce significativamente di più rispetto al parentale M82, come riportato in [Tab.3.2](#) e come si può notare in **Fig. 3.1** dove sono mostrate una pianta di *S. lycopersicum* cv M82 ed una di *S. lycopersicum* IL 6-4 a 55 giorni dalla semina.

3.1.2 Analisi dello ionoma

Come riportato in [Tab. 3.3](#) il confronto tra la concentrazione di microelementi nella foglia apicale, basale e nelle radici in piante di *S. lycopersicum* M82 allevate in idroponica o in perlite alla presenza di soluzione nutritiva di base ha mostrato che la perlite influenza in maniera statisticamente significativa l'assorbimento radicale di tutti gli elementi, eccezion fatta per il piombo. Nessuna differenza è stata invece rilevata dal confronto nella foglia apicale e basale.

Come si può notare, infine, in [Tab.3.4](#) l'analisi dei valori delle concentrazioni dei microelementi nella foglia apicale, basale e nelle radici di piante di *S. lycopersicum* M82 e di *S. lycopersicum* IL 6-4, allevate in idroponica alla presenza della soluzione nutritiva di base, ha mostrato che i due genotipi sono indistinguibili tra loro tranne che per il manganese che è assorbito di meno nell'IL, ma è traslocato di più solo nella foglia basale.

3.2 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro *Solanum lycopersicum* cv M82 allevate fuori suolo in presenza di varie concentrazioni di cadmio, piombo e zinco.

3.2.1 Analisi della crescita

Come riportato in [Tab.3.5](#), dal confronto dei dati di crescita valutati come peso fresco della parte aerea e delle radici di piante di *S. lycopersicum* M82 allevate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10µM o Cd 20µM, Pb 3µM o Pb 6µM, Zn 100µM o Zn 200µM, o con tutti e tre gli elementi alle concentrazioni più basse citate essi non hanno mostrato differenze significative.

3.2.2 Analisi dello ionoma

Come si può osservare nelle [Tab. 3.6](#) e [3.7](#), che riassumono i dati relativi alle analisi ioniche effettuate su piante del genotipo M82, allevate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10µM o Cd 20µM, all'aumentare del cadmio, si nota un aumento generale di tale elemento in tutti gli organi, ma

diminuisce la percentuale di questo elemento che si accumula nell'apice rispetto alla radice (dal 17% al 5%).

Nelle [Tab. 3.8](#), e [3.9](#), che riassumono i dati relativi alle analisi ioniche effettuate su piante del genotipo M82 trattate allevate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Pb 3 μ M o Pb 6 μ M, all'aumentare del piombo, si nota che esso si accumula solo nelle radici con un massimo del 25% in più rispetto al controllo a concentrazione più bassa, per poi decrescere al 16% in più rispetto al controllo alla concentrazione più alta.

Quando le piante sono sottoposte a trattamento con zinco 100 μ M e 200 μ M ([Tab. 3.10 e 3.11](#)) le piante di M82 si comportano in maniera ancora diversa: si osserva comunque un aumento della concentrazione di zinco nei vari organi in funzione dell'aumento della concentrazione del trattamento rispetto al controllo: a concentrazione più bassa nella radice è otto volte maggiore, nella foglia basale di una volta e mezzo come lo è all'incirca nella foglia apicale; a concentrazione più alta si accumula circa una volta e mezzo di più rispetto al controllo nella radice, cinque volte in più nella foglia basale e tre volte in più nella foglia apicale, ma, in ogni caso, è mantenuto il rapporto di accumulo tra i diversi organi di circa 20 volte in più in radice rispetto alla foglia apicale.

Quando infine i tre elementi vengono somministrati contemporaneamente ([Tab. 3.12](#)) la concentrazione del cadmio varia in modo statisticamente significativo arrivando ad essere undici volte di più rispetto al controllo nella radice; lo zinco si accumula solo nella radice in maniera statisticamente significativa, raggiungendo concentrazioni di ventisette volte maggiori rispetto al controllo.

3.3 Analisi della crescita e dello ionoma in piante di pomodoro del genotipo *S. lycopersicum* cv M82 e del genotipo *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate fuori suolo in presenza di cadmio 10 μ m, zinco 100 μ m e loro combinazione.

3.3.1 Analisi della crescita

L'analisi delle variazioni biometriche dei genotipi *Solanum lycopersicum* cv M82 e *Solanum lycopersicum* IL 6-4, valutandone il comportamento nella sola soluzione nutritiva di base o addizionata con i metalli di interesse, evidenzia che nel genotipo M82 ([Tab.3.13](#)) la presenza di cadmio e zinco somministrati da soli o in combinazione mostra non influenzare la crescita della parte aerea del genotipo parentale; un decremento significativo del peso delle sole radici si osserva solo alla presenza del trattamento combinato. Viceversa il genotipo IL 6-4 ([Tab.3.14](#)) risponde accumulando maggiore biomassa, soprattutto nelle radici (45% in più) alla presenza di cadmio, mostrando una sofferenza significativa pari al 54% in meno, maggiormente nella parte aerea, alla presenza di zinco.

Confrontando infine i due genotipi tra loro alla presenza dei trattamenti ([Tab.3.15](#)) si nota che la linea IL alla presenza di cadmio accumula maggiore biomassa rispetto al parentale coltivato, in particolare nella parte aerea, con un aumento in tale organo del 142%.

3.3.2 Analisi dello ionoma

L'analisi dello ionoma dei genotipi *S. lycopersicum* cv M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 valutandone il comportamento nella sola soluzione nutritiva di base o addizionata con i metalli di interesse, ha evidenziato i seguenti comportamenti

mostrati nelle tabelle che seguono (prima separatamente e poi, ove possibile, confrontandoli tra di loro).

Come riportato nella [\(Tab.3.16\)](#) nella cv M82 le analisi hanno mostrato che alla presenza di cadmio, tale inquinante si accumula in maniera significativa nelle radici, ma soprattutto nelle foglie basali e ancor più cospicuamente nelle foglie apicali. Inoltre il manganese si accumula in maniera significativa nelle foglie basali, mentre il piombo e lo zinco risultano essere traslocati nelle foglie apicali.

Nel genotipo IL 6-4 le analisi hanno mostrato che alla presenza di cadmio esso si accumula in maniera statisticamente rilevante solo nella foglia apicale, come si può osservare nella [Tab. 3.17](#).

Come si può notare nella [Tab. 3.18](#) alla presenza di un eccesso di zinco la cultivar M82 ha mostrato un incremento significativo nell'accumulo di tale micronutriente nelle foglie basali ed apicali. Tale comportamento è confermato anche nelle radici. Rispetto alla soluzione nutritiva in cui la concentrazione di zinco è 1µM l'accumulo di tale micronutriente alla presenza di una sua concentrazione cento volte superiore risulta essere pari al 450% negli apici, al 1.000% nelle foglie basali e al 900% nelle radici. Degli altri microelementi solo il manganese si concentra nelle foglie basali in maniera statisticamente significativa.

Come si può notare, invece, nella [Tab. 3.19](#) l'effetto dello zinco sull'IL si traduce in una diminuzione della traslocazione del cadmio, ma in un suo maggiore accumulo nella radice, mentre lo zinco si accumula e viene traslocato otto volte di più.

Nella [Tab. 3.20](#) è illustrato l'effetto combinato di cadmio e zinco su M82: essi si accumulano in tutti gli organi in percentuali paragonabili. E' da notare che lo zinco nella radice si accumula in ragione del doppio in più rispetto agli apici.

Nelle [Tab.3.21](#) e [3.22](#) si paragonano gli effetti dei singoli trattamenti, rispettivamente cadmio prima e zinco dopo, nei confronti del trattamento combinato sul genotipo M82. La presenza del cadmio in associazione con lo zinco riduce l'accumulo di quest'ultimo nelle foglie basali in maniera statisticamente rilevante, il cromo viene assorbito di più nelle radici e il manganese viene traslocato di meno.

Invece la presenza di zinco in combinazione con il cadmio abbatte in maniera importante e significativa l'assorbimento, l'accumulo e la traslocazione di quest'ultimo; si osserva anche una moderata traslocazione verso l'apice del manganese e una correlazione negativa sull'accumulo e l'assorbimento del rame.

Paragonando infine tra loro il comportamento dei due genotipi alla presenza dei trattamenti si osserva che: alla presenza di cadmio il genotipo IL 6-4 accumula meno zinco, piombo e rame rispetto alla cultivar, ma contemporaneamente sembrerebbe traslocare maggiore quantità di cadmio, malgrado ne assorba di più ([Tab. 3.23](#)); alla presenza di zinco il genotipo IL 6-4 mostra un maggiore accumulo di zinco e rame nelle radici; il trattamento con zinco è correlato positivamente con l'accumulo del rame ([Tab. 3.24](#)).

3.4 Identificazione di sequenze di geni dell'omeostasi di metalli in pomodoro

Il disegno di primer per l'amplificazione dei geni prescelti per l'omeostasi di metalli in pianta si è avvalso in prima istanza dell'identificazione di sequenze altamente conservate ottenute mediante multi allineamento effettuato tramite i software T-Coffee e ClustalW.

In **Fig. 3.2** è riportato un esempio di allineamento tra le sequenze nucleotidiche del gene *mtp* da tre specie differenti, in cui si evince la presenza di zone nucleotidiche altamente conservate. Il disegno dei primer è stato effettuato su tali sequenze, ma in alcuni casi si è proceduto al disegno di più di una coppia di primer, in quanto si trattava di sequenze geniche di molte migliaia di basi. La bontà dei primer è stata valutata con reazioni di amplificazione *in vitro* utilizzando come stampo DNA genomico estratto da tessuti fogliari di diverse specie vegetali, quali *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Phalaris canariensis*, *Cicer arietinum* e *Solanum lycopersicum*. La **Fig. 3.3** è un esempio di determinazione della validità di tale strategia bioinformatica, da cui è possibile rilevare un pattern elettroforetico variabile nelle differenti specie, tranne nella specie modello *Arabidopsis* e nel pomodoro. In entrambe le specie è possibile rilevare la presenza di un amplicone avente peso molecolare di 1.650 nucleotidi.

In **Fig. 3.4**, pannello A, è mostrato il risultato dell'amplificazione per il gene *znt* utilizzando la coppia di primer 217-218: sono state rilevate due bande, una dal peso molecolare compreso tra 1.600 e 2.000 bp, che rispetta le dimensioni attese in base agli studi preliminari effettuati sulle sequenze presenti in banca dati; una di dimensioni minori, di circa 700 bp che potrebbe essere un prodotto aspecifico della reazione. Per il gene *ysl* l'amplificazione mediante i primer 206-207 ha prodotto un profilo con tre bande di dimensioni di 1.600 bp, 1.200 bp e 600 bp (**Fig. 3.4**, pannello B). Si noti che in questo caso la banda di circa 1.600 bp, rappresentante l'amplicato atteso. I primer 213-216 per il gene *nramp* hanno invece amplificato un prodotto di circa 1500 bp, come da noi atteso, e un prodotto dal peso molecolare molto basso di circa 400 bp (**Fig. 3.4**, pannello C). Nell'ultimo caso riportato, l'amplificazione con i primer 209-212 ha prodotto una banda molto evidente dal peso molecolare di circa 1.500 bp e 4 bande molto meno evidenti di peso molecolare comprese tra i 300 e i 750 bp (**Fig. 3.4**, pannello D).

Le sequenze di 1.800 bp del gene *znt*, di 1.600 bp per il gene *ysl*, di 1500 bp per il gene *nramp* e di 1.500 bp per il gene *hma* sono state soggette ad analisi di sequenziamento.

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche ottenute dagli ampliconi con i singoli geni, condotta tramite il programma BLAST come descritto in precedenza, ha evidenziato la mancata identità delle sequenze da noi clonate; infatti in tutti i casi, tali sequenze risultano essere regioni non codificanti del DNA di pomodoro e non i geni ricercati (**Fig. 3.5**).

Al fine di individuare in pomodoro i geni per i trasportatori di metalli da noi cercati, abbiamo sviluppato un sistema di PCR *in silico*, utilizzando la banca dati di EST del SGN, Solanacee Genomic Network. Per prima cosa è stata effettuata una ricerca in vari database, tra tutti l'NCBI, per individuare il maggior numero possibile di sequenze dei diversi geni codificanti per proteine trasportatrici dei metalli. In seguito abbiamo utilizzato tali accessioni per investigare la succitata banca dati di EST del SGN.

I primer sono stati utilizzati in reazioni di amplificazione *in vitro* mediante PCR del DNA genomico di *Solanum lycopersicum* cv M82 e *Solanum pennellii* e si sono ottenuti amplificati delle dimensioni attese per il gene *ysl* utilizzando i primer 264 e 265 e per il gene utilizzando i primer 262 e 263 *znt*, come si può osservare in **Fig.3.6** e **3.7**.

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche dei singoli geni ha mostrato un'alta percentuale d'identità con le sequenze degli stessi geni di altre specie. Tale alta identità conferma che la nuova strategia seguita con l'approccio bioinformatico usato per disegnare i primer è risultata valida. Nella **Fig. 3.8** è mostrato per il gene *ysl* la ricerca nella banca data NCBI la percentuale di identità con sequenze nucleotidiche *ysl* in altre specie vegetale. Tale ricerca ha mostrato la sequenza nucleotidica di *ha* mostrato un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene *ysl1* di tabacco.

La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta *in silico* utilizzando il programma Transeq (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: L'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco.

La sequenza nucleotidica di *znt1* clonata risulta avere invece identità del 96% con la sequenza codificante completa del gene *znt1* di *Chengiopanax sciadophylloides*, mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'identità del 79% con la sequenza proteica sempre della specie *Chengiopanax sciadophylloides*.

La validità dei primer ottenuti con il terzo tipo di approccio è stata saggiata con la messa a punto di un adatto protocollo di amplificazione *in vitro*.

In **Fig.3.9** è mostrata l'analisi elettroforetica dopo amplificazione *in vitro* con le seguenti coppie di primer: 326-327, 332-333, 326-333, 327 e 332 per il gene *ysl*. La presenza di ampliconi è stata rilevata soltanto utilizzando la coppia di primer 327 - 332, di circa 1200 coppie di nucleotidi per tutti genomi di *Solanum* analizzati.

L'analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche di *S. lycopersicum* cv San Marzano, selezione 6, *S. lycopersicum* cv M82 e Money maker (**Fig. 3.10**) ha mostrato una percentuale del 98% d'identità tra le stesse. L'analisi *in silico* mostra che ciascuna sequenza nucleotidica ha evidenziato un'alta percentuale d'identità in media del 70% con la sequenze del gene *ysl 5* di *A. thaliana*, oltre che un'alta identità (99%) con il clone C02HBa0165K22 del contig 24 del cromosoma 2 (**Fig. 3.11, 3.12, 3.13**).

L'analisi elettroforetica per i prodotti di amplificazione *in vitro* ottenuti dalla coppia di primer 318-319 per il gene *hma* ha mostrato la presenza di ampliconi di circa 650 coppie di nucleotidi per tutti genomi di *Solanum* analizzati (**Fig. 3.14**). Gli ampliconi ottenuti da *S. lycopersicum* cv M82, Money Maker, *S. lycopersicum* S. Marzano, selezione 6, *S. pennellii* e *Solanum habrocaites* sono stati sequenziati e l'analisi comparativa di queste sequenze nucleotidiche tramite multi allineamento **Fig. 3.15** ha mostrato una percentuale del 97% d'identità tra di esse.

L'analisi *in silico* mostra che ciascuna sequenza nucleotidica del putativo gene di *hma* evidenzia un'alta percentuale d'identità in media del 72% con la sequenze del gene *hma5* di *A. thaliana*, oltre che ovviamente un'alta identità (99%) con il clone 45, contig C08HBa0251H04 del cromosoma 8 su cui i primer erano stati disegnati (**Fig. 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20**).

Per la coppia di primer 317-318 l'analisi elettroforetica ha mostrato la presenza di ampliconi di circa 2000 coppie di nucleotidi (bp) per tutti genomi di *Solanum* analizzati (**Fig. 3.21**). Dopo la purificazione descritta in precedenza gli ampliconi sono stati sequenziati e si è ottenuta una sequenza solo per il genotipo *S. pennellii*. L'analisi *in silico* di tale sequenza mostra un'alta percentuale d'identità (72%) con la sequenze del gene *hma 5* di *A. thaliana*, oltre che un'alta identità (99%) con il clone 45, contigC08HBa0251H04 del cromosoma 8 su cui i primer erano stati disegnati (**Fig. 3.22**).

4. DISCUSSIONI

Un aspetto salutistico che è stato sviluppato nel presente progetto è la qualità nutrizionale legata alla presenza di elementi minerali. E' noto che le piante hanno capacità di assorbire dal suolo e dall'ambiente metalli indispensabili per la loro sopravvivenza. E' però anche noto che alcune specie o genotipi di piante d'interesse alimentare possono assorbire in grande quantità oltre a questi metalli (specie iperaccumulatrici) anche altri metalli che possono interferire con i processi di conservazione e trasformazione industriale. Studi specifici su questi aspetti nutrizionali dell'assorbimento di metalli dal suolo sono recenti (Salt, 2008).

A tal fine è stato messo a punto un sistema sperimentale atto a studiare l'assorbimento, la traslocazione e l'accumulo di metalli quali zinco, cadmio e piombo in piante di pomodoro dei genotipi *S. lycopersicum* cv M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate fuori suolo in condizioni controllate alla presenza di concentrazioni e combinazioni diverse dei metalli d'interesse.

Gli esperimenti preliminari sono stati progettati per studiare la risposta fenotipica delle piante in funzione sia dei due diversi sistemi di coltivazione (idroponica pura e idroponica alla presenza di perlite), allestiti entrambi alla presenza della sola soluzione nutritiva di base, sia di eventuali differenze tra i due genotipi analizzati.

L'analisi del fenotipo delle piante di *S. lycopersicum* cv M82 ha mostrato che mentre la crescita, in termini di peso fresco, non è influenzata significativamente dai due diversi sistemi di coltivazione, la presenza della perlite influenza invece negativamente l'assorbimento radicale di tutti gli elementi analizzati, escluso il piombo (Tab 3.1,3.3). La localizzazione a livello radicale di tali differenze potrebbero essere attribuibili a un adsorbimento aspecifico dei metalli da parte di tale tipo di substrato, riportato invece come inerte, il quale potrebbe comportarsi da chelante nei confronti dei metalli stessi e renderli quindi meno biodisponibili per l'assorbimento radicale. Non si può però escludere che tale diminuzione dell'assorbimento radicale, in questo sistema di coltura, sia imputabile a una sofferenza radicale correlata alla mancanza di ossigenazione aggiuntiva, presente invece nella coltura in idroponica pura. Tale ipotetica sofferenza radicale non sembrerebbe però supportata dai dati di crescita che mostrano valori comparabili del peso fresco delle radici delle piante allevate sia in coltura idroponica che in perlite.

Il successivo confronto dello sviluppo del fenotipo, in coltura idroponica, dei due genotipi *S. lycopersicum* cv M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 ha fatto osservare differenze significative, che portano ad ipotizzare una risposta genotipo dipendente. E' stato, infatti, osservato un incremento importante nella crescita della pianta intera, correlata in particolare ad un maggiore accumulo di biomassa nella parte aerea, della linea d'introgresione rispetto al parentale coltivato (Tab 3.2); inoltre l'analisi dello ionoma ha mostrato che i due genotipi non appaiono distinguibili, eccetto che per il Mn ed il Cr, che sono assorbiti di meno dalla IL 6-4 rispetto al parentale.

Il confronto dei dati di crescita, valutati come peso fresco della parte aerea e delle radici, di piante di *S. lycopersicum* cv M82 allevate in perlite, utilizzando una soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10 μ M, Cd 20 μ M, Pb 3 μ M, Pb 6 μ M, Zn 100 μ M, Zn 200 μ M somministrati singolarmente o in combinazione, alle concentrazioni più basse riportate per ciascun elemento, non ha mostrato differenze significative, confermando che le concentrazioni scelte per la

nostra sperimentazione rispondevano al progetto sperimentale di utilizzare concentrazioni non tossiche di tali elementi.

L'analisi quantitativa e simultanea della composizione degli elementi presenti nei diversi organi di *Solanum lycopersicum* M82, dopo cinquantacinque giorni di allevamento in perlite in presenza delle diverse concentrazioni di cadmio, piombo e zinco su riportate, eseguite mediante ICP-MS, ha mostrato che i tratti correlati all'omeostasi ionica risultano modificati significativamente in risposta ai trattamenti imposti.

A) In presenza di concentrazioni crescenti di cadmio, si osserva, come atteso, un corrispondente aumento di tale metallo in tutti gli organi, anche se in risposta a concentrazioni maggiori di tale metallo la pianta aumenta il suo accumulo a livello radicale, in percentuale rispetto agli altri organi, lasciando ipotizzare che sia indotta l'attivazione di meccanismi di sequestro a livello radicale. Considerando che è riportato in letteratura che la soglia minima per definire una pianta iperaccumulatrice per il cadmio è 100 µg/g del peso secco, è interessante osservare che tali piante mostrano una notevole capacità di tollerare alte concentrazioni di cadmio anche nella parte aerea considerando che i valori di cadmio da noi osservati nelle foglie apicali campionate in seguito al trattamento con CdSO₄ 20µM era 62,5±11,4 µg/g p.s.

B) Un risultato completamente diverso si è ottenuto analizzando l'accumulo del piombo in risposta a concentrazioni crescenti di tale metallo pesante: tale elemento, infatti, sembrerebbe accumularsi in concentrazioni elevate esclusivamente nell'apparato radicale, a differenza di quanto riportato in letteratura per altre specie. È riportata, infatti, la capacità di assorbire, traslocare e accumulare piombo (Deng 2005) in diverse specie vegetali cresciute su suoli inquinati, nelle quali tale elemento risulta essere uniformemente distribuito tra la parte aerea e la parte radicale. D'altro canto è ugualmente riportata in letteratura la capacità di alcune piante eduli come il riso di evitare sia l'assorbimento che l'accumulo di tale metallo (Pallavi Sharma 2005) anche in presenza di concentrazioni molto maggiori delle nostre (1000µM contro 6 µM). I nostri risultati sono particolarmente interessanti perché dimostrano che piante di pomodoro cresciute in presenza di piombo non hanno la capacità di immagazzinare tale metallo nella parte "verde" della pianta, ma limitano il suo assorbimento ed accumulo esclusivamente nella radice. Tale caratteristica è estremamente importante se inserita in un'ottica di sicurezza alimentare, considerando che il pomodoro è una delle principali piante eduli coltivate in tutto il mondo.

C) Quando le piante sono sottoposte a trattamento con zinco si osserva che nel caso del trattamento con ZnSO₄ 100 µM, esse accumulano tale micronutriente sia nella radice che nella parte aerea, lasciando presumere l'attivazione di meccanismi di trasporto preposti al suo assorbimento, alla sua traslocazione e al suo accumulo, come riportato in letteratura (Michael J 2007, Cosio 2004) per altre specie vegetali. Quando la pianta è trattata invece con concentrazioni doppie di zinco (200µM) essa, pur mantenendo lo stesso rapporto di accumulo, pari a 20, tra la parte radicale e la parte apicale, osservato in presenza di concentrazioni più basse di tale nutriente (100µM), mostra invece un incremento dell'accumulo di tale elemento nei diversi organi, in maniera percentualmente superiore all'aumento di concentrazione del trattamento stesso. Tali risultati potrebbero far pensare che tale genotipo, sia in grado di ben tollerare concentrazioni di zinco elevate quali 100µM, come evidenziato dalle analisi fenotipiche e ioniche eseguite, presumibilmente mantenendo attivi o

attivando *ex novo* i meccanismi di trasporto preposti alla sua compartimentalizzazione nei diversi organi. A concentrazioni maggiori di tale metallo (200 μ M) la pianta reagisce non modificando la sua traslocazione agli apici, ma aumentando il suo accumulo in tutti gli organi, prediligendo l'accumulo vacuolare a livello radicale. Tali risultati lasciano ipotizzare che in presenza di concentrazioni elevate di zinco siano coordinatamente upregolati tutti i meccanismi preposti al suo assorbimento, alla sua traslocazione e al suo accumulo, ed in particolare quelli appartenenti alla famiglia delle ATPasi deputate al trasporto dei metalli pesanti (HMA), e che sono coinvolte in particolare nell'estrusione dello zinco dalla cellula radicale e nella sua traslocazione agli apici. Lo sbilanciamento verso l'accumulo radicale di tale ione potrebbe lasciar ipotizzare invece l'attivazione di meccanismi di trasporto preposti al controllo dell'omeostasi cellulare quali l'MTP1 e lo ZIF1, riportati entrambi per essere coinvolti nell'accumulo di tale metallo nel vacuolo della cellula radicale (Puig e Penarrubia, 2009). Essendo ZIF1 indotto da un eccesso di Zn, potrebbe ipotizzarsi un meccanismo di detossificazione di tale ione, attraverso il suo sequestro vacuolare (Kramer et al. 2007.)

D) La risposta della pianta alla presenza contemporanea di zinco, cadmio e piombo è stata la modifica completa dei profili di assorbimento, traslocazione e accumulo dei metalli rispetto a quanto osservato nella risposta a ciascun singolo metallo (**Tab 3.6 e 3.12**). Infatti si osserva che mentre lo zinco, a pari concentrazione rispetto al trattamento singolo, è accumulato tre volte in più in tutti gli organi, il cadmio è invece assorbito, traslocato ed accumulato in misura nettamente inferiore (-50%) rispetto al trattamento singolo, in tutti gli organi. Effetti analoghi Tale risultato è supportato da quanto riportato in letteratura da Hart nel 2002, il quale osserva che il cadmio può utilizzare gli stessi trasportatori utilizzati dallo zinco per il suo assorbimento e la sua traslocazione (Hart 2002). È inoltre riportata una possibile interazione di tali metalli, qualora somministrati in forma combinata a dosi superiori di quelle richieste normalmente per la crescita (Parameswaran 2005). Tale interazione potrebbe lasciar ipotizzare una forma di competizione di tali metalli per gli stessi trasportatori. Infatti sia il cadmio che lo zinco appartengono al gruppo IIB dei metalli di transizione, e posseggono proprietà chimiche, geo-chimiche e ambientali simili.

Il terzo gruppo di esperimenti ha riguardato lo studio della risposta fenotipica delle piante di pomodoro *S. lycopersicum* cv M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate fuori suolo in idroponica, in condizioni controllate e la risposta di tali genotipi alla crescita in presenza di concentrazioni, analogamente alla sperimentazione su riportata, elevate ma non letali, dei metalli di interesse.

Dall'analisi dei dati di crescita (peso fresco) della cv. M82 risulta che in presenza del doppio trattamento si osserva un diminuzione significativo nella crescita della sola radice nel genotipo parentale (**Tab.3.13**); se si analizza il comportamento della pianta nel medesimo trattamento anche in rapporto alla distribuzione degli ioni (**Tab.3.20**), si nota che in tutti gli organi si accumulano sia cadmio che zinco in percentuale paragonabile; tale comportamento, oltre che a supportare anche, in questo caso, l'idea dell'esistenza di uno stesso carrier per l'assorbimento, la traslocazione e l'accumulo come già riportato precedentemente (Grotz e Guerinot, 2006), fa ipotizzare anche che la pianta incanali una parte dell'energia a sua disposizione, per la sintesi e/o l'attivazione di meccanismi di uptake dei metalli piuttosto che per la traslocazione e l'accumulo di biomassa nella radice. L'effetto sinergico di detossificazione che si osserva in risposta all'applicazione dei due trattamenti in forma combinata (**Tab 3.21, 3.22**) lascerebbe ipotizzare che in seguito

a tali trattamenti siano attivati meccanismi responsabili non solo del controllo omeostatico dello zinco ma anche della detossificazione del cadmio. Considerando che la presenza del cadmio in associazione con lo zinco, correla negativamente con l'accumulo dello zinco, nelle foglie basali e nelle radici, e che la presenza dello zinco in presenza di cadmio correla positivamente con la mancanza di accumulo del cadmio in tutti gli organi, si potrebbe ipotizzare che i meccanismi che intervengono nel controllo omeostatico dello zinco siano gli stessi che la pianta attiva per operare un'azione di detossificazione nei confronti del cadmio, attraverso trasportatori quali AtHMA4, per il quale si può assumere che agisca da detossificante non solo per lo zinco in eccesso ma anche per il cadmio, essendo noto il suo ruolo non solo in fenomeni correlati al controllo dell'omeostasi dello zinco e al trasporto del cadmio, ma anche nella detossificazione dello zinco quando la sua concentrazione è elevata (Williams and Mills 2005). L'azione combinata di un controllo su HMA3, un altro membro della famiglia del subgruppo dello Zn/Cd/Co/Pb che può contribuire alla detossificazione dei metalli, sequestrando Cd e Pb nel vacuolo (Gravot et al. 2004), non è da escludersi in considerazione del movimento di altri ioni quali Mn, Pb e Cr e della correlazione positiva allo zinco che si osserva .

Analizzando l'accumulo di biomassa nei vari organi di piante di *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate in soluzione nutritiva di base o addizionata con cadmio si può osservare un aumento della biomassa, soprattutto nelle radici pari al 45% rispetto al controllo; ciò potrebbe essere attribuibile alla sintesi di una maggiore quantità di biomassa nelle radici per sequestrare il cadmio in tale organo. Come infatti appare evidente nella **Tab 3.17**, relativa alle analisi ioniche, in tale trattamento la maggior parte del cadmio risulta essere accumulata esclusivamente nella radice. Si potrebbe ipotizzare che tale accumulo di biomassa sia direttamente correlato all'attivazione di meccanismi di detossificazione i quali potrebbero passare o attraverso il direccionamento dell'energia fotosintetica verso la sintesi di acido malico, utilizzato come anione accompagnante il suo sequestro nel vacuolo, come riportato da Iwashita nel 2008 per *Arabidopsis Hallery*, una pianta iperaccumulatrice, o verso la sintesi di trasportatori della famiglia HMA, ed in particolare di HMA3 per l'accumulo di Cadmio nel vacuolo e di HMA4 responsabile del carico di tale metallo nello xilema, e quindi della sua traslocazione agli apici, come riportato per specie non accumulatrici da Verbruggen *et al.* (2009).

La sofferenza nella crescita, sia a carico della parte aerea che radicale, riscontrata nell'analisi dei dati dell'accumulo della biomassa della linea di introgressione, osservata in presenza di concentrazioni elevate di zinco, potrebbe essere spiegato ipotizzando l'insorgenza di fenomeni di inibizione della fotosintesi, riscontrati spesso in presenza di concentrazione di zinco che la pianta può percepire come tossicità indotta dalla carenza di ferro conseguente all'uptake dello zinco in competizione con il ferro stesso (Marschner 1997). Tale tossicità indotta è stata infatti associata recentemente alla sovraregolazione di trasportatori della famiglia ZIP, ed in particolare di IRT1 deputato al trasporto del ferro, il quale è noto trasportare anche lo zinco (Pilon et al nel 2009). Tale trasportatore, che risulta normalmente attivato in presenza di Ferro carenza, ha come conseguenza un contestuale aumento dell'uptake dello zinco, che porta ad una ferro deficienza, come descritto per *Arabidopsis* da Pilon et al nel 2009. Potrebbe essere attribuita a tale deficienza indotta, la difficoltà riscontrata nella crescita della IL 6-4 in presenza di un eccesso di zinco. Tali risultati sembrerebbero indicare un probabile effetto antagonista dei due metalli (cadmio e zinco) sulla crescita della IL 6-4 e lasciano ipotizzare l'attivazione di

meccanismi di trasporto diversi per tali metalli e soprattutto meccanismi di accumulo attivati con finalità fisiologiche completamente diverse.

Lo studio delle differenze fenotipiche tra M82 e IL 6-4 condotte confrontando le analisi ioniche di tali genotipi (**Tab. 3.23**, **Tab. 3.24**) mostra delle differenze statisticamente significative relativamente alla capacità di assorbire, traslocare ed accumulare i diversi metalli sia in presenza di un eccesso di cadmio che in presenza di un eccesso di zinco, putativamente attribuibili alla introgressione di una porzione di cromosoma di *S.pennellii* in *Solanum lycopersicum*. In presenza di un eccesso di cadmio la linea d'introgressione trasloca meno zinco, piombo e rame nella regione apicale rispetto al parentale coltivato; inoltre tale linea, pur mostrando di assorbire meno cadmio rispetto al parentale coltivato, bilancia la capacità di accumulo di M82, incrementandone la traslocazione. In presenza di un eccesso di zinco, invece, la linea di introgressione mostra un maggiore accumulo di zinco e di rame nelle radici rispetto al parentale coltivato, ma una minore traslocazione di zinco verso gli apici rispetto al parentale. La correlazione positiva tra zinco e rame riscontrata nella IL 6-4 lascia ipotizzare o il coinvolgimento di uno stesso traslocatore responsabile del controllo della omeostasi di tali metalli o l'attivazione di un trasportatore a bassa specificità, che non riesce a discriminare perfettamente tra i due metalli. La presenza di meccanismi di trasporto a bassa specificità sono d'altro canto ampiamente riportati in letteratura (Grotz e Guerinot 2006).

Appare evidente, sulla base delle considerazioni su riportate, che vi sia un cross-talk tra i diversi metalli studiati. D'altro canto, essendo ferro, manganese e rame assorbiti dallo stesso traslocatore (RT1), non è possibile escludere che questi stessi metalli possano influenzare l'uptake di altri metalli. E' riportato infatti in letteratura che se IRT1 è up-regolato nella condizioni di ferro deficienza conseguente alla presenza di un eccesso di zinco, esso può provocare l'aumento dell'assorbimento dello zinco a sfavore del ferro stesso. In conseguenza di ciò, in condizioni di eccesso di zinco, si osserva una clorosi da carenza di ferro. Tale variazione dell'omeostasi del ferro indotta dallo zinco potrebbe a sua volta portare ad una variazione nell'uptake anche di altri micronutrienti quali Cu e probabilmente Mn, a cui lo zinco va a sostituirsi, essendo tutti questi micronutrienti caratterizzati dall'essere metalli di transizione. Tali considerazioni potrebbero spiegare l'accumulo del Cu, da noi riscontrato, in condizione di eccesso di zinco. Tale accumulo potrebbe essere mediato da traslocatori specifici, quale HMA5, riportato essere responsabile del controllo dell'omeostasi del rame in condizione di eccesso di rame, analogamente a quanto riportato per HMA2/4 responsabile del controllo dello zinco (Andreas-Colas et al 2006, Hussain D et al 2004, Mills et al. 2005). Malgrado ci siano strettissimi interazioni tra l'omeostasi del ferro e quella del rame, così come tra quella del ferro e dello zinco, tra quella del ferro e del manganese, tra quella dello zinco e del rame, vi sono limitate evidenze per la coordinazione del network di regolazione dell'omeostasi del ferro, del rame dello zinco e del manganese, malgrado si stia delineando l'importanza di tale coordinazione nel controllo dello stato redox della cellula, operata attraverso l'omeostasi dei metalli di transizione (Totter S. et al 2008, Delhaize et al 2007, Peiter et al 2007).

La specificità dei trasportatori, i patterns di espressione e le localizzazioni sub cellulari delle proteine deputate al trasporto dei metalli e al loro controllo sono tutt'ora oggetto di ampi studi, volti a comprendere il ruolo di tali trasportatori nell'assorbimento, nella traslocazione e nell'accumulo di macronutrienti, micronutrienti, metalli, non-metalli, metalloidi, benefici e/o tossici e la coordinazione

operata dalla pianta per il controllo dell'omeostasi ionica (Grotz and Guerinot, 2006; Pilon et al.2009; Puig e Penarrubia, 2009).

Il presente lavoro di tesi si è proposto di identificare geni che contribuiscano in maniera sostanziale al rapido sviluppo di nuovi prodotti di pomodoro e suoi derivati attraverso l'analisi strutturale e funzionale del genoma di pomodoro e contribuire con tecnologie genetiche e genomiche per l'ottenimento di una mappa ionomica ottenuta dalla sovrapposizione di analisi sull'omeostasi ionica e sull'espressione genica.

Grazie agli studi eseguiti, in banca dati, oggi esistono le sequenze nucleotidiche di diversi geni implicati nel trasporto di metalli già clonati in diverse specie. Questi possono essere divisi in due sottogruppi: "Metal Efflux Protein" e "Metal Uptake Protein". di queste abbiamo scelto le più rappresentate nelle diverse specie vegetali, che sono risultate essere: *ysl* (yellow stripe-like protein) e *nramp* ([Natural resistance-associated macrophage protein](#)) come trasportatori del ferro , *znt* (Zinc transporter) *hma* (heavy metal transporter) e *mtp* (metal transporter protein) come trasportatori di cadmio e zinco.

I geni studiati sono stati scelti sia perché risultano essere tra i più rappresentati nelle varie famiglie vegetali sia perché risulta di particolare importanza il ruolo di tali geni nell'omeostasi dei metalli in pianta.

Il gene Yellow Stripe 1, identificato per la prima volta in mais (*Zea mays*) (Wiren et al; 1994), codifica per una proteina di membrana che trasporta Fe(III) accoppiato a nicotinammina. Studi successivi hanno rivelato che tale proteina appartiene ad una famiglia, specifica delle piante (Guerinot et al; 2006), di trasportatori di oligopeptidi, presente in un gran numero di organismi (Yen et al; 2001). Sono infatti già stati individuati 18 membri in *Oryza sativa* e 8 in *Arabidopsis thaliana*. Studi strutturali hanno evidenziato la presenza di 14 domini trans membrana altamente conservati.

I vari membri della famiglia delle YSL svolgono nei processi di omeostasi del ferro funzioni differenti. In *Arabidopsis* è stato evidenziato che AtYSL1 viene espresso nello xilema e sembra essere fondamentale per il trasporto a lunga distanza del ferro nei vari organi della pianta, mentre AtYSL2, espressa principalmente nei tessuti radicali, è coinvolta nei processi di assorbimento del ferro.

Inoltre, è stata evidenziata la presenza di tale famiglia anche in tabacco (*Nicotiana tabacum*) mentre non è ancora stata verificata in pomodoro.

Anche *nramp* rappresenta una famiglia di geni composta da diversi membri, implicata nel trasporto di diversi cationi bivalenti, incluso il ferro; studi su *At nramp1* mostrano che tale proteina incrementa la resistenza anche a livelli tossici di ferro in piante che la overesprimono (Thomine 2000) e ristabilisce la capacità in ceppi di lievito mutanti, di assorbire ferro (Bereczky J. 2003).

Il gene *znt* fa parte della famiglia delle ZIP (ZRT-IRT-protein), generalmente contribuiscono all'omeostasi ionica trasportando cationi all'interno del citoplasma.

Più di 100 ZIP proteine sono state identificate in batteri funghi animali e piante (Guerinot M.L., 2000).

È noto il coinvolgimento di geni ZIP nell'accumulo di metalli in specie iperaccumulatrici: sono stati riscontrati alti livelli della proteina endogena TcZNT1 in correlazione all'incremento di assorbimento di zinco nelle radici della specie *Thlaspi caerulescens*, iperaccumulatrice di zinco e cadmio (Pence NS 2000).

Il gene *hma* appartiene alla famiglia delle P1b-type ATPase, proteine che usano l'energia derivante dall'idrolisi di ATP per traslocare cationi attraverso membrane biologiche; studi sulle HMA2 e HMA4 di *Arabidopsis thaliana* mostrano che tali proteine sono implicate nel trasporto di diversi cationi bivalenti come zinco cadmio piombo e cobalto, in particolare, l'espressione di HMA2 in lieviti mutanti ha permesso di caratterizzare tale proteina per il trasporto sia dello zinco che del cadmio (Eren 2004).

Per ultimo, il gene *mtp* appartiene alla famiglia di CDF, cation diffusion facilitator, codificanti antiporti per portare i metalli fuori dal citoplasma. AtMTP1 è stato il primo di tali trasportatori ad essere studiato, e si è riscontrata una sua capacità di conferire tolleranza allo zinco se overespresso. L'espressione di AtMTP1-GFP in protoplasti di *Arabidopsis thaliana* ha permesso di individuare la localizzazione di tale proteina sulle membrane vacuolari di foglie e radici, suggerendone un ruolo nel sequestro dello zinco nel vacuolo stesso, ipotesi confermata dal minor accumulo di zinco in piante in cui AtMTP1 è silenziato (Kobae Y. 2004)

Le banche dati rappresentano il materiale sperimentale della bioinformatica. Esse possono essere classificate in quattro grosse categorie: Banche Dati di biosequenze;; Banche Dati genomiche; Banche Dati di espressione genica e Banche Dati di proteomica. La Banca Dati del National Center for Bioinformaic Information, comunemente chiamata NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), è il classico e più importante esempio di database per gli studi computazionali in biologia molecolare, in cui sono sviluppati programmi appositi per l'analisi delle sequenze genomiche in essa presenti.

Grazie alle sequenza nucleotidiche reperibili in banca dati è stato possibile usare un approccio bio-informatico per disegnare primer utili all'isolamento di sequenze geniche dei geni scelti. Due software disponibili in rete il cui nome è T-coffee (<http://www.es.emblnet.org/Services/MolBio/t-coffee/>) clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw/) permettono di allineare 2 o più sequenze fornendo un file in output che, anche grazie a una differente scala di colori, permette di identificare le zone altamente identiche tra le sequenze allineate. Con tali software si è proceduto ad allineare le sequenze dei geni già clonati nelle altre specie vegetali reperibili dalla banca dati del NCBI. L'analisi *in silico* degli allineamenti ha mostrato che essi hanno delle zone nelle quali esiste un'alta identità di sequenza. Ipotizzando che tali zone siano quelle più conservate si è proceduto a disegnare su esse coppie di primer utilizzabili nelle future amplificazioni *in vitro* sul DNA.

Le amplificazioni effettuate con tali primer hanno prodotto ampliconi delle dimensioni attese per quattro dei cinque geni ricercati: *znt*, *ysl*, *nramp* e *hma*.

Gli ampliconi sono stati inseriti in vettori di clonaggio e in seguito sequenziati, ma non hanno fornito identità con i geni da noi ricercati: le sequenze ottenute sono risultate essere regioni non codificanti del genoma di pomodoro. Per verificare tale risultato, le sequenze sono state tradotte *in silico* mediante il programma Transeq (www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/) e nessuno dei 6 frame di lettura prodotti per ciascuna sequenza isolata è risultato essere codificante per alcun peptide.

I primer da noi disegnati sui multi allineamenti delle sequenze esistenti in banca dati non sono risultati utili a isolare i geni da noi scelti in pomodoro, nonostante tali primer risultassero efficienti ad amplificare i geni stessi se utilizzati su DNA di *Arabidopsis* così come i controlli *in silico* e *in vitro* da noi effettuati hanno dimostrato.

La ragione di questo mancato funzionamento può derivare da vari motivi, come ad esempio il diverso codon usage che le due specie adottano, diminuendo la specificità dei primer quando utilizzati in pomodoro.

Va inoltre ricordato che i primer da noi disegnati non sono degenerati quando nei multi allineamenti era presente un mismatch, ma disegnati mantenendo la base azotata maggiormente rappresentata. Queste due possibili discriminanti, unite alla presenza di errori tecnici che sempre possono essere presenti in campo scientifico e molecolare potrebbero essere la causa del mancato funzionamento dei primer da noi disegnati sui multi allineamento in pomodoro.

Risulta in altro modo interessante che in pomodoro siano state amplificate in questo modo bande di pari peso molecolare che in *Arabidopsis*, che sono risultate essere regioni non codificanti del genoma.

Abbiamo così deciso di modificare la strategia per la costruzione dei primer; al fine di individuare in pomodoro i geni per i trasportatori di metalli da noi cercati, abbiamo sviluppato un sistema di PCR *in silico*, utilizzando la banca dati di EST del SGN, Solanaceae Genomic Network. Per prima cosa è stata effettuata una ricerca in vari database, tra tutti l'NCBI, per individuare il maggior numero possibile di sequenze dei diversi geni codificanti per proteine trasportatrici dei metalli. In tal modo abbiamo potuto costruire un nostro database, con tutte le accessioni e le sequenze codificanti complete già studiate in diverse specie vegetali. In seguito abbiamo utilizzato tali accessioni per investigare la succitata banca dati di EST del SGN.

È stato così possibile individuare 22 sequenze geniche in diverse specie vegetali, già studiate come trasportatori di metalli, che avessero riscontro in pomodoro con elevata omologia di sequenza nucleotidica.

Sono state così identificate diverse EST altamente omologhe per i geni *ysl*, *znt* e *mtp* in pomodoro; tali sequenze confermano la presenza in pomodoro dei geni ricercati. Gli EST da noi ottenuti sono stati in seguito organizzati in Uni Gene, sovrapponendo tra di loro gli EST di ogni gene cercato, in modo da ottenere un'unica sequenza nucleotidica rappresentante l'mRNA completo di ciascun gene. In tal modo si è potuto disegnare nuovi primer maggiormente specifici per i geni individuati. Le analisi di amplificazione hanno prodotto amplificati per i geni *ysl* e *znt*.

La sequenza nucleotidica di *ysl1* ottenuta è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati ed è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene *ysl1* di tabacco (*Nicotiana tabacum*). La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta *in silico* e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

La sequenza nucleotidica di *znt1* da noi clonata è risultata avere invece un'identità del 96% con la sequenza codificante completa del gene *znt1* di *Chengiopanax sciadophylloides*, mentre la risultante sequenza amminoacidica possiede un'identità del 79% con la sequenza proteica sempre di *Chengiopanax sciadophylloide*.

Infine mediante la terza strategia, che si è avvalsa di strumenti sviluppati da un gruppo di ricerca europeo (Sanseverino *et al.*, 2009), atti a correlare dati di identità a livello nucleotidico con i dati di identità a livello proteico per individuare in modo

altamente specifico sequenze di geni. In questo modo, sono state ottenute sequenze putative dei geni *ysl* e *hma* in *Solanum lycopersicum*.

5.CONCLUSIONE

Il presente lavoro di tesi rappresenta la base per uno studio preliminare per lo sviluppo di una mappa ionomica in pomodoro, mediante la sovrapposizione delle informazioni sull'omeostasi ionica relativa ad un pool di metalli e l'espressione genica dei trasportatori dei metalli di interesse.

Sono stati effettuati studi sul comportamento di piante di *S. lycopersicum* e della linea d'introgressione IL 6-4, allevate in differenti concentrazioni di cadmio piombo e zinco , che hanno permesso di tracciare un quadro sul comportamento del pomodoro a concentrazioni non fisiologiche di tali elementi

Inoltre è stato possibile identificare le sequenze parziali dei geni *ysl* e *znt* in *S. lycopersicum* mediante l'utilizzo di banche dati pubbliche, di pari passo col costante apporto di nuove informazioni sul genoma di pomodoro provenienti dal progetto internazionale di sequenziamento della specie in esame. La metodologia utilizzata nel disegno di primer su sequenze EST, nonché quella sui contig hanno costituito stato un valido approccio per investigare la presenza di trasportatori di metallo in pomodoro e potranno essere utilizzate per isolare e caratterizzare nuove sequenze dal genoma di tale specie.

6. TABELLE E FIGURE

TABELLA 1.1 - Putativa specificità e localizzazione dei principali trasportatori di metalli in pianta.

Name	Family members in <i>A. thaliana</i>	Proposed specificity	Cellular location	Main tissue expression
Heavy metal ATPases (P _{1B})	8			
RAN1		Cu	Post-Golgi	Whole plant
PAA1		Cu	Chloroplast	
Ca ²⁺ -ATPases (P _{2A})	4			
ECA1		Mn ²⁺	ER	Roots?
Nramp	6 (+EIN2)			
AtNramp 1		Fe, Mn		Roots
AtNramp 2		=		Roots
AtNramp 3		Fe, Cd, Mn	Vacuole	Roots/shoots
AtNramp 4		Fe, Mn		Roots/shoots
OsNramp 1		Mn, Fe		Roots
OsNramp 2		Mn		Leaves
OsNramp 3		Mn		Roots/leaves
LeNramp1		Fe		Root vascular parenchyma
CDF	8			
ZAT (AtMTP1)		Zn	Vesicular/vacuolar	All tissues
TcZTP1		Zn	Intracellular membranes	Leaves, roots
TgMIP1		Cd, Co, Zn, Ni	Vacuole	Leaves
ShMTP1		Mn	Intracellular membranes	Roots, leaves
ZIP	15			
IRT1		Fe, Zn, Mn, Cd	PM	Roots
IRT2		Fe, Zn		Roots
OsIRT1		Fe		Roots
LeIRT1		Fe (broad?)		Roots
LeIRT2		broad?		Roots
TcZNT1		Zn, Cd		Roots, shoots
TcZNT2		-		Roots
ZIPs1-3		Zn		Roots
ZIP4		Zn	Plastids	Roots, shoots
GmZIP1		Zn	Peribacteroid membrane	Root nodules
Cation/H ⁺ antiporters	12			
CAX 2		Ca, Mn, Cd	Vacuole	Roots
ABC transporters	128	PC-Cd, GS-Cd		
ID17		Fe		
COPT1-5	5	Cu		Leaves, stems, flowers
GNGC channels	20	Ni, Pb	PM	

TABELLA 2.1. – Componenti della soluzione nutritiva di base

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	708.45 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	492.94 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
KH_2PO_4	136.09 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
K_2SO_4	348.50 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	396.39 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	441.09 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
H_3BO_3	2.868 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.545 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
EDTA-Fe	33.0345 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.220 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.080 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0299 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

TABELLA 2.2 – Volumi di soluzioni di ZnSO_4 51,49 mM di PbNO_3 3mM e di CdSO_4 65 mm addizionati nei diversi trattamenti.

Cd 5 μ M	Cd 10 μ M	Cd 20 μ M	Pb 1,5 μ M	Pb 3 μ M	Pb 6 μ M	Zn 50 μ M	Zn 100 μ M	Zn 200 μ M
μ l115	μ l230	μ l460	μ l750	ml1,5	ml3	ml1,5	ml3	ml6

TABELLA 2.3 – Schema dell’esperimento su piante della cultivar *Solanum lycopersicum* M82 allevate in idroponica su perlite nella soluzione nutritiva di base o impiegando tre diverse concentrazioni di cadmio (5µM-10µM-20µM), piombo (1,5µM-3µM-6µM), zinco (50µM-100µM-200µM) o il trattamento contemporaneo con cadmio piombo e zinco a concentrazioni intermedie.

Trattamento	Repliche <i>in vivo</i>
Controllo	10
ZnSO ₄ 50µM	3
ZnSO ₄ 100µM	3
ZnSO ₄ 200µM	3
CdSO ₄ 5µM	3
CdSO ₄ 10µM	3
CdSO ₄ 20µM	3
PbNO ₃ 1,5µM	3
PbNO ₃ 3µM	3
PbNO ₃ 6µM	3
CdSO ₄ 10µM + PbNO ₃ 3µM + ZnSO ₄ 100µM	3

TABELLA 2.4 – Schema dell'esperimento su piante di *Solanum lycopersicum* M82 e *Solanum lycopersicum* IL allevate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con cadmio 10µM, zinco 100µM o con il trattamento contemporaneo

Trattamento	Repliche <i>in vivo</i>
Controllo	10
ZnSO ₄ 100µM	10
CdSO ₄ 10µM	10
CdSO ₄ 10µM +ZnSO ₄ 100 µM	10

TABELLA 2.5. Elenco e principali caratteristiche dei geni scelti per l'isolamento in pomodoro

Nome	Famiglia	Localizzazione	Specificità
<i>zrt</i> , zinc regulated transporter	ZIP	epidermide (radici)	Zn
<i>hma</i> , heavy metal transporter	P1BType-ATPase	periciclo-xilema (radici)	Cd-Zn
<i>mtp</i> ,metal transporting protein	CDF	vacuoli (foglie e radici)	Cd Ni Zn
<i>ysl</i> , yellow stripe-like	YSL	endoderma, periciclo (radici e apici)	Fe
<i>nramp</i> , natural resistance associated macrophage protein	NRAMP	vacuolo (radici, apici)	Fe

N° primer <i>hma</i>	Sequenza	N° primer <i>mtp</i>	Sequenza	N° primer <i>nramp</i>	Sequenza	N° primer <i>ysl</i>	Sequenza	N° primer <i>znt</i>	Sequenza
209	CACGACAGTCTCCTCATCTC	266	TGTTACCACYCARSAYCATS	213	CTCATGGAAGAAGCTTTGGC	205	CCTTCACAAGGCAGGAGAAC	217	ACGAAAATCCTCTGTGATGC
210	TGGATACGTCTATGTAGGTG	267	TGTHCCATMTCRAGCARACC	214	GCATTTGCTTGGATGTTTGG	206	TCAACAGCTTCCACACACCC	218	GGACATGCTCATGGACAATC
211	CAAACAGACTTGCATTGTCC			215	ATGGCTATCACAAGAGCAGC	207	CCACACACATGTCTGATGGCG	219	TGCTTAGAAAATCAGCTGCG
212	CTCCTGCAACAGCTTTTACC			216	TAACTGCCAAGGAGTGTACG	208	AACGTCCAAAGCCCTTCTCC	220	ACATAAGTCCAGCTCCAAGG
317	ATGGTGATTGGAGGGACTTT					264	ATAGCCTTCAGCGGAGG	262	GAACTCAATTTGCTGGTGG
318	TTACTCAACTGTGATACCTT					265	ACGGTCATGTAACCTGTC	263	ATGGCCTTTTTGGTATCATTC
319	TGTTGAAGAAGCAAAACCTG					326	TTATTGGATGATGAGACGTC		
320	CAGGTTTTGCTTCTTCAACT					327	ATGGATAGTAGTAGATCCGA		
						328	TGCAGCTAGTCCAGCAAGAA		
						329	TTCTTGCTGGACTAGTGCA		
						330	TAGCTCCTTGTGGGGTATGG		
						331	CCATACCCCACAAGGAGCTA		
						332	AGTTCCGACACTTTGCAACC		
						333	GGTTGCAAAGTGTGGGAAC		
						334	ATGAATAATAGCAACAGAGA		
						335	TCAAGAAGCCAAGAATTTC		
						336	AAGCAGAATGGTTCCTGCT		
						337	AGCAGGGAACCATTCCTT		

TABELLA 2.6 – Elenco dei primer utilizzati per le reazioni di amplificazione per i geni *hma*, *mtp*, *nramp*, *ysl* e *znt*.

TABELLA 3.1 – Confronto tra il peso fresco della parte aerea (LSFW) e della radice (RFW) di piante di *S. lycopersicum* cv M82 allevate in idroponica o in perlite in presenza di soluzione nutritiva di base. Dati raccolti da piante di 55 giorni dalla semina.

Sistema di allevamento	LSFW	RFW
	(g)	(g)
Perlite	12,6±8,4	11,1±5,7
Idroponica	17,0±5,3	11,6±0,6

TABELLA 3.2. – Media e deviazione standard del peso fresco totale (PFW), delle parte aerea (LSFW) e delle radici (RFW) di piante di *S. lycopersicum* M82 e di *S. lycopersicum* IL 6-4 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina.

Genotipo	PFW	LSFW	RFW
	(g)	(g)	(g)
M82	28,7±4,7*	17,0±5,3*	11,6±0,6
IL 6-4	47,0±1,0	34,3±0,4	12,7±0,5

*p<0,05

TABELLA 3.3 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica o in perlite nella soluzione nutritiva di base. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Sistema	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
di allevamento									
A	Idroponica	0,0±0,0	0,0±0,0	1,1±0,8	0,8±0,9	3,6±1,0	0,4±0,5	0,1±0,0	16,1±5,2
	Perlite	0,0±0,0	0,1±0,1	0,3±0,1*	0,8±0,4	8,6±5,0	0,1±0,2	0,1±0,1	16,0±4,1
B	Idroponica	0,0±0,0	0,0±0,0	0,6±0,5	0,6±0,5	3,4±0,0	0,2±0,2	0,2±0,1	20,0±1,5
	Perlite	0,0±0,0	0,1±0,1	0,3±0,3	0,8±0,5	7,4±2,2*	0,2±0,3	0,2±0,2	12,7±4,0*
R	Idroponica	0,0±0,0	0,7±0,9	3,5±0,3	12,0±1,9	16,9±0,9	2,3±0,5	1,6±1,8	42,0±1,6
	Perlite	0,4±0,1**	1,6±1,6	0,5±0,2***	4,3±1,5***	7,4±2,4**	0,4±0,4***	0,9±0,6	86,5±56,8

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005

TABELLA 3.4 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Genotipo	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	M82	0,0±0,0	0,0±0,0	1,1±0,8	6,9±7,8	3,6±1,0	0,4±0,5	i.d.	9,9±13,9
	IL	0,0±0,0	0,1±0,0	0,4±0,1	3,6±2,5	4,9±0,8	0,2±0,1	i.d.	16,2±4,2
B	M82	0,0±0,0	0,1±0,1	0,6±0,5	10,0±12,7	3,4±0,0	0,2±0,2	i.d.	10,5±14,9
	IL	0,0±0,0	1,1±1,2	0,3±0,1	2,3±0,1	6,2±0,5*	0,5±0,0	i.d.	13,5±4,8
R	M82	i.d.	i.d.	3,5±0,3	12,0±1,9	16,9±0,9	2,3±0,5	1,6±1,9	i.d.
	IL	i.d.	i.d.	0,9±0,2**	4,9±6,6	9,3±1,9*	0,4±0,4	id.	i.d.

*p<0,05 **p<0,01 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.5 – Confronto tra il peso fresco della parte aerea delle piante (LSFW) e delle radici (RFW) di piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10µM o Cd 20µM, Pb 3µM o Pb 6µM, Zn 100µM o Zn 200µM, o con tutti e tre gli elementi alle concentrazioni più basse citate. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Trattamento	LSFW (g)	RFW (g)
Sol. Base	10,8±7,4	10,3±4,6
Cd 10 µM	11,5±2,5	12,5±1,3
Cd 20 µM	11,1±2,9	13,1±3,5
Sol. Base	10,8±7,4	10,3±4,6
Pb 3 µM	13,5±2,1	12,6±1,1
Pb 6 µM	12,2±5,2	9,9±2,1
Sol. Base	10,8±7,4	10,3±4,6
Zn 100 µM	16,6±13,7	13,8±2,4
Zn 200 µM	18,5±1,2	12,1±2,2
Sol. Base	10,8±7,4	10,3±4,6
Cd 10 µM + Pb 3 µM+ Zn 100µM	14,4±3,5	14,7±1,9

TABELLA 3.6 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. Lycopersicum* M82 allevate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	8,6 \pm 5,0	0,2 \pm 0,2	i.d.	16,0 \pm 4,1
	Addiz.	i.d.	25,7 \pm 10,7***	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 1,1	12,8 \pm 5,0	0,1 \pm 0,0	i.d.	11,4 \pm 1,2
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	0,8 \pm	7,4 \pm 2,2	0,3 \pm 0,4	i.d.	i.d.
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	11,5 \pm 1,9***	0,2 \pm 0,0	0,8 \pm 0,9	8,5 \pm 0,3	0,4 \pm 0,6	i.d.	i.d.
R	Base	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 1,6	0,5 \pm 0,2	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	0,4 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	86,5 \pm 56,8
	Addiz.	0,4 \pm 0,1	249,7 \pm 158,4**	0,9 \pm 0,5	5,8 \pm 2,4	9,6 \pm 8,4	1,1 \pm 1,1	1,1 \pm 0,1	41,6 \pm 8,0

p<0,01 *p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.7 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 20 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	8,6 \pm 5,0	0,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	16,0 \pm 4,1
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	62,5 \pm 11,4***	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	12,1 \pm 3,3	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,3	9,9 \pm 0,7
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,5	7,4 \pm 2,2	0,3 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2	12,7 \pm 4,0
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	51,0 \pm 17,3***	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,3	10,5 \pm 4,6	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	11,9 \pm 4,0
R	Base	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 1,6	0,5 \pm 0,2	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	0,4 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	86,5 \pm 56,8
	Addiz.	0,6 \pm 0,2	345,5 \pm 88,3***	0,8 \pm 0,6	6,4 \pm 0,8	4,9 \pm 0,4	0,4 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	62,3 \pm 7,6

***p<0,005

TABELLA 3.8 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Pb 3 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	i.d.	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	8,6 \pm 5,0	i.d.	0,1 \pm 0,1	16,0 \pm 4,1
	Addiz.	i.d.	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,2	7,2 \pm 1,3	i.d.	0,2 \pm 0,0	6,5 \pm 0,3*
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	i.d.	7,4 \pm 2,2	i.d.	0,2 \pm 0,2	12,7 \pm 4,0
	addiz.	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	id.	10,6 \pm 1,8	i.d.	0,3 \pm 0,2	5,5 \pm 0,9*
R	Base	0,4 \pm 0,12	1,6 \pm 1,6	0,5 \pm 0,2	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	0,4 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	86,5 \pm 56,8
	addiz.	0,7 \pm 0,1*	1,9 \pm 2,2	1,0 \pm 0,7	7,3 \pm 2,2	7,1 \pm 1,0	0,7 \pm 0,1	25,1 \pm 0,4***	51,5 \pm 15,4
*p<0,05 ***p<0,005 id. dati insufficienti per analisi statistica									

TABELLA 3.9 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S.lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Pb 6 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	i.d.	i.d.	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	8,6 \pm 5,0	0,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	i.d.
	Addiz.	i.d.	i.d.	0,1 \pm 0,0	0,5 \pm 0,4	7,0 \pm 0,5	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	i.d.
B	Base	0,0 \pm 0,0	i.d.	0,3 \pm 0,3	i.d.	7,4 \pm 2,2	0,3 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2	i.d.
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	i.d.	0,2 \pm 0,1	i.d.	7,8 \pm 1,2	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	i.d.
R	Base	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 1,6	0,5 \pm 0,2	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	i.d.	0,9 \pm 0,6	86,5 \pm 56,8
	Addiz.	0,4 \pm 0,1	2,0 \pm 0,7	0,7 \pm 0,0	4,8 \pm 0,8	6,0 \pm 0,8	i.d.	16,5 \pm 6,6***	103,0 \pm 109,0

***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.10 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Zn $100 \mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0±0,0	0,1±0,1	0,3±0,1	0,8±0,4	8,6±5,0	0,2±0,2	i.d.	16,0±4,1
	Addiz.	0,0±0,0	0,1±0,0	0,5±0,2	3,0±2,6*	10,1±2,4	0,6±0,5	i.d.	37,1±4,9***
B	Base	0,0±0,0	0,1±0,1	0,3±0,3	0,8±0,5	7,4±2,2	0,3±0,4	i.d.	12,7±4,0
	Addiz.	0,0±0,0	0,1±0,0	0,4±0,0	1,8±1,5	9,9±2,6	0,6±0,2	i.d.	33,3±23,8*
R	Base	0,4±0,1	1,6±1,6	0,5±0,2	4,3±1,5	7,4±2,4	i.d.	0,9±0,6	86,5±56,8
	Addiz.	0,7±0,4	0,2±0,1	1,7±1,5*	7,6±4,7	8,5±2,7	i.d.	1,6±1,0	773,6±255,9***
*p<0,05 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica									

TABELLA 3.11 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{-1} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Zn 200 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	i.d.	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	8,6 \pm 5,0	0,2 \pm 0,2	i.d.	16,0 \pm 4,1
	Addiz.	i.d.	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	1,2 \pm 0,6	8,4 \pm 3,4	0,2 \pm 0,0	id.	64,7 \pm 38,3**
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,5	7,4 \pm 2,2	0,3 \pm 0,4	i.d.	12,7 \pm 4,0
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	9,7 \pm 4,5	0,5 \pm 0,0	i.d.	81,4 \pm 44,6**
R	Base	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 1,6	0,5 \pm 0,2	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	0,4 \pm 0,4	0,9 \pm 0,6	86,5 \pm 56,0
	Addiz.	0,4 \pm 0,0	1,9 \pm 1,1	1,1 \pm 0,3**	7,1 \pm 1,1*	11,4 \pm 3,0	1,2 \pm 0,3*	0,7 \pm 0,4	1261,9 \pm 271,7***

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.12 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g}^{\text{g}^{-1}} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in perlite nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10 μM , Pb 3 μM e Zn 100 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	i.d.	0,1 \pm 0,1	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
	Addiz.	i.d.	13,7 \pm 18,8*	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
B	Base	i.d.	0,1 \pm 0,1	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	12,7 \pm 4,0
	Addiz.	i.d.	15,2 \pm 21,5*	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	77,0 \pm 103,0
R	Base	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 1,6	0,5	4,3 \pm 1,5	7,4 \pm 2,4	0,4 \pm 0,4	i.d.	86,5 \pm 56,8
	Addiz.	0,5 \pm 0,4	159,5 \pm 125,8**	i.d.	4,4 \pm 3,0	5,1 \pm 1,7	0,6 \pm 0,8	i.d.	2026,2 \pm 1862,6*

*p<0,05 **p<0,01 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.13 – Media e deviazione standard del peso fresco (PFW), della parte aerea (LSFW) e delle radici (RFW) di piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10 μ M o Zn 100 μ M o la loro combinazione. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Trattamento	PFW	LSFW	RFW
	(g)	(g)	(g)
Sol. Base	28,7 \pm 4,7*	17,0 \pm 5,3*	11,6 \pm 0,6
Cd 10 μ M	28,1 \pm 7,2	17,0 \pm 4,9	11,2 \pm 2,3
Sol. Base	28,7 \pm 4,7*	17,0 \pm 5,3*	11,6 \pm 0,6
Zn 100 μ M	22,4 \pm 2,8	16,0 \pm 1,1	6,4 \pm 1,6
Sol. Base	28,7 \pm 4,7*	17,0 \pm 5,3*	11,6 \pm 0,6
Cd 10 μ M +Zn 100 μ M	27,8 \pm 8,7	19,6 \pm 8,0	8,2 \pm 0,7

*p<0,05

TABELLA 3.14 – Media e deviazione standard del peso fresco (PFW), delle parte aerea (LSFW) e delle radici (RFW) di piante di *S. lycopersicum* IL coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10 μ M o Zn 100 μ M. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Trattamento	PFW	LSFW	RFW
	(g)	(g)	(g)
Sol. Base	47,0 \pm 1,0*	34,3 \pm 0,4*	12,7 \pm 0,5**
Cd 10 μ M	59,7 \pm 2,8	41,2 \pm 2,2	18,5 \pm 0,6
Sol. Base	47,0 \pm 1,0**	34,3 \pm 0,4*	12,7 \pm 0,5
Zn 100 μ M	25,1 \pm 0,1	15,6 \pm 3,6	9,6 \pm 3,7

*p<0,05 **p<0,01

TABELLA 3.15 – Media e deviazione standard del peso fresco (PFW), delle parte aerea (LSFW) e delle radici (RFW) di piante di *S. lycopersicum* M82 con piante di *S. lycopersicum* IL coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base addizionata con Cd 10µ□M o Zn 100µ□M. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Trattamento	Genotipo	PFW	LSFW	RFW
		(g)	(g)	(g)
Cd 10 µM	M82	28,1±7,2	17,0±4,9	11,2±2,3
	IL	59,7±2,8	41,2±2,2*	18,5±0,6*
Zn 100 µM	M82	22,4±2,8	16,0±1,1	6,4±1,6
	IL	25,1±0,1	15,6±3,6	9,6±3,7

*p<0,05

TABELLA 3.16 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd $10\mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,8	0,8 \pm 0,9	3,6 \pm 1,0	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,0	16,1 \pm 5,2
	Addiz.	0,1 \pm 0,0	52,2 \pm 1,5***	2,3 \pm 1,9	41,2 \pm 7,5	4,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1**	69,3 \pm 1,6**
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,5	0,6 \pm 0,5	3,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	20,0 \pm 1,5
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	60,1 \pm 6,8**	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	7,8 \pm 0,8*	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	21,4 \pm 2,8
R	Base	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,9	3,5 \pm 0,3	12,0 \pm 1,9	16,9 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5	1,6 \pm 1,9	42,0 \pm 1,6
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	431,4 \pm 106,4*	5,4 \pm 2,5	12,1 \pm 3,4	10,8 \pm 2,7	3,6 \pm 2,8	0,8 \pm 0,1	111,1 \pm 36,4

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.17 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* IL coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd 10^{-6} M. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0±0,0	0,1±0,0	0,4±0,1	3,6±2,5	4,9±0,9	0,2±0,9	0,1±0,0	16,2±4,2
	Addiz.	0,0±0,0	54,3±15,0*	5,3±4,0	7,1±1,4	2,8±0,7	0,2±0,1	0,2±0,2	26,0±0,6
B	Base	0,0±0,0	1,1±1,2	0,3±1,1	2,3±0,1	6,2±0,5*	0,5±0,0	0,3±0,1	13,5±4,8
	Addiz.	0,0±0,0	108,5±42,4	1,7±0,5	2,9±0,4	6,0±3,1	0,2±0,3	0,1±0,0	14,0±6,0
R	Base	i.d.	0,2±0,1	0,9±0,2	4,9±6,6	10,7±7,1	0,7±0,3	2,4±3,1	30,5±31,9
	Addiz.	i.d.	339,3±112,3	1,1±1,3	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	62,7±11,3

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.18 –Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Zn 100 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,8	0,8 \pm 0,9	3,6 \pm 1,0	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,0	16,1 \pm 5,2
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	93,6 \pm 4,9***
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,5	0,6 \pm 0,5	3,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	20,0 \pm 1,5
	Addiz.	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1*	0,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	4,8 \pm 0,2**	0,6 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	418,0 \pm 88,9**
R	Base	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,9	3,5 \pm 0,3	12,0 \pm 1,9	16,9 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5	1,6 \pm 1,9	42,0 \pm 1,6
	Addiz.	0,1 \pm 0,0	3,9 \pm 1,2	1,1 \pm 1,3	8,4 \pm 2,7	11,7 \pm 2,5	1,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	437,0 \pm 144,8

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.19 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* IL 6-4 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Zn $100\mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
B	Base	0,0±0,0	1,1±1,2	0,3±0,1	2,3±0,1	6,2±0,5*	0,5±0,0	0,3±0,1	13,5±4,8
	Addiz.	0,0±0,0	0,1±0,0*	1,0±0,2*	4,2±0,3*	3,9±0,6	0,2±0,1	0,1±0,0	105,9±22,1*
Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
R	Base	17,2±24,2	0,2±0,1	0,9±0,2	4,9±6,6	5,7±7,1	4,4±5,3	2,4±3,2	30,5±31,8
	Addiz.	0,0±0,0	1,3±0,3*	2,6±1,3	53,6±12,9	16,4±2,7	0,7±0,4	45,8±±58,3	12.142,5±68,6***

*p<0,05 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.20 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base o addizionata con Cd $10\text{ }\mu\text{M}$ + Zn $100\text{ }\mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,8	0,8 \pm 0,9	3,6 \pm 1,0	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,0	16,1 \pm 5,2
	Addiz.	0,1 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2**	1,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,5	5,8 \pm 0,0	0,5 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	93,5 \pm 0,7**
B	Base	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,6 \pm 0,5	0,6 \pm 0,5	3,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	20,0 \pm 1,5
	Addiz.	0,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3**	0,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	5,9 \pm 0,5*	0,3 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	71,2 \pm 4,0**
R	Base	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,9	3,5 \pm 0,3	12,0 \pm 1,9	16,9 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5	1,6 \pm 1,9	42,0 \pm 1,6
	Addiz.	0,2 \pm 0,2	13,4 \pm 0,1**	10,7 \pm 13,8	4,8 \pm 0,0*	8,9 \pm 1,4*	5,1 \pm 6,0	0,3 \pm 0,4	284,1 \pm 44,4*
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005									

TABELLA 3.21 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base addizionata con Cd $10\mu\text{M}$ o Cd $10\mu\text{M}$ + Zn $100\mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Cd $10\mu\text{M}$	0,1 \pm 0,0	52,2 \pm 1,5	2,3 \pm 1,9	41,2 \pm 7,5	4,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	69,3 \pm 1,6
	Cd $10\mu\text{M}$ +Zn $100\mu\text{M}$	0,1 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2***	1,3 \pm 0,2	0,9 \pm 0,5*	5,8 \pm 0,0**	0,5 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0**	93,5 \pm 0,7**
B	Cd $10\mu\text{M}$	0,0 \pm 0,0	60,1 \pm 6,8	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	7,8 \pm 0,8	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	21,4 \pm 2,8
	Cd $10\mu\text{M}$ +Zn $100\mu\text{M}$	0,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3**	0,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	5,9 \pm 0,5	0,3 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	71,2 \pm 4,0**
R	Cd $10\mu\text{M}$	0,0 \pm 0,0	431,4 \pm 106,4	5,4 \pm 2,5	12,1 \pm 3,4	10,8 \pm 2,7	3,6 \pm 2,8	0,8 \pm 0,1	111,1 \pm 36,4
	Cd $10\mu\text{M}$ +Zn $100\mu\text{M}$	0,2 \pm 0,2	13,4 \pm 0,1*	10,7 \pm 13,8	4,8 \pm 0,0	8,9 \pm 1,4	5,1 \pm 6,0	0,3 \pm 0,4	284,1 \pm 44,4
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005									

TABELLA 3.22 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base addizionata con Zn 100 μM o Cd 10 μM + Zn 100 μM . Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	Zn 100 μM	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	93,6 \pm 4,9
	Cd 10 μM + Zn 100 μM	0,1 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2**	1,3 \pm 0,2*	0,9 \pm 0,5	5,8 \pm 0,0**	0,5 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	93,5 \pm 0,7
B	Zn 100 μM	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	4,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	418,0 \pm 88,9
	Cd 10 μM + Zn 100 μM	0,1 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3**	0,5 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	5,9 \pm 0,5	0,3 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	71,2 \pm 4,0*
Prelievo	Soluz.	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
R	Zn 100 μM	0,1 \pm 0,0	3,9 \pm 1,2	1,1 \pm 1,3	8,4 \pm 2,7	11,7 \pm 2,5	1,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	437,0 \pm 144,8
	Cd 10 μM + Zn 100 μM	0,2 \pm 0,2	13,4 \pm 0,1	10,7 \pm 13,8**	4,8 \pm 0,0	8,9 \pm 1,4	5,1 \pm 6,0	0,3 \pm 0,4	284,1 \pm 44,4

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

TABELLA 3.23 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ s.s.}$) nella foglia apicale (A), basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 e di *S. lycopersicum* IL coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base addizionata con Cd $10^{-6} \mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Genotipo	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
A	M82	0,1 \pm 0,0	52,2 \pm 1,5	2,3 \pm 2,0	41,2 \pm 7,5	4,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	69,3 \pm 1,6
	IL	0,0 \pm 0,0*	54,3 \pm 15,0	5,3 \pm 4,0	7,1 \pm 1,4*	2,8 \pm 0,7	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,2*	26,0 \pm 0,6***
B	M82	0,0 \pm 0,0	60,1 \pm 6,8	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	7,8 \pm 0,8	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	21,4 \pm 2,8
	IL	0,0 \pm 0,0	108,5 \pm 42,4	1,7 \pm 1,6	2,9 \pm 0,4	6,0 \pm 3,1	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,0	14,0 \pm 6,0
R	M82	0,0 \pm 0,0	431,4 \pm 106,4	5,4 \pm 2,5	12,1 \pm 3,4	10,8 \pm 2,8	3,6 \pm 2,8	0,8 \pm 0,1	111,1 \pm 36,4
	IL	0,1 \pm 0,0	339,3 \pm 112,3	1,1 \pm 1,0	7,5 \pm 2,8	6,9 \pm 2,9	0,2 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1	62,7 \pm 11,3

*p<0,05 ***p<0,005

TABELLA 3.24 – Media e deviazione standard della concentrazione di microelementi ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ s.s.}$) nella foglia basale (B) e nelle radici (R) in piante di *S. lycopersicum* M82 e di *S. lycopersicum* coltivate in idroponica nella soluzione nutritiva di base addizionata con Zn $10 \pm 0 \mu\text{M}$. Dati rilevati in piante di 55 giorni dalla semina, compresi 15 giorni del trattamento.

Prelievo	Genotipo	As	Cd	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
B	M82	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	4,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	418,0 \pm 88,9
	IL	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0*	1,0 \pm 0,2	4,2 \pm 0,4**	3,9 \pm 0,6	0,2 \pm 0,1	i.d.	105,9 \pm 22,1*
R	M82	0,1 \pm 0,0	3,9 \pm 1,3	1,1 \pm 1,3	8,4 \pm 2,7	11,7 \pm 2,5	1,3 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	437,0 \pm 144,8
	IL	i.d.	1,3 \pm 0,1	2,6 \pm 1,3	53,6 \pm 12,9*	16,4 \pm 2,7	0,7 \pm 0,4	i.d.	12142,5 \pm 68,6***

*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,005 i.d. dati insufficienti per analisi statistica

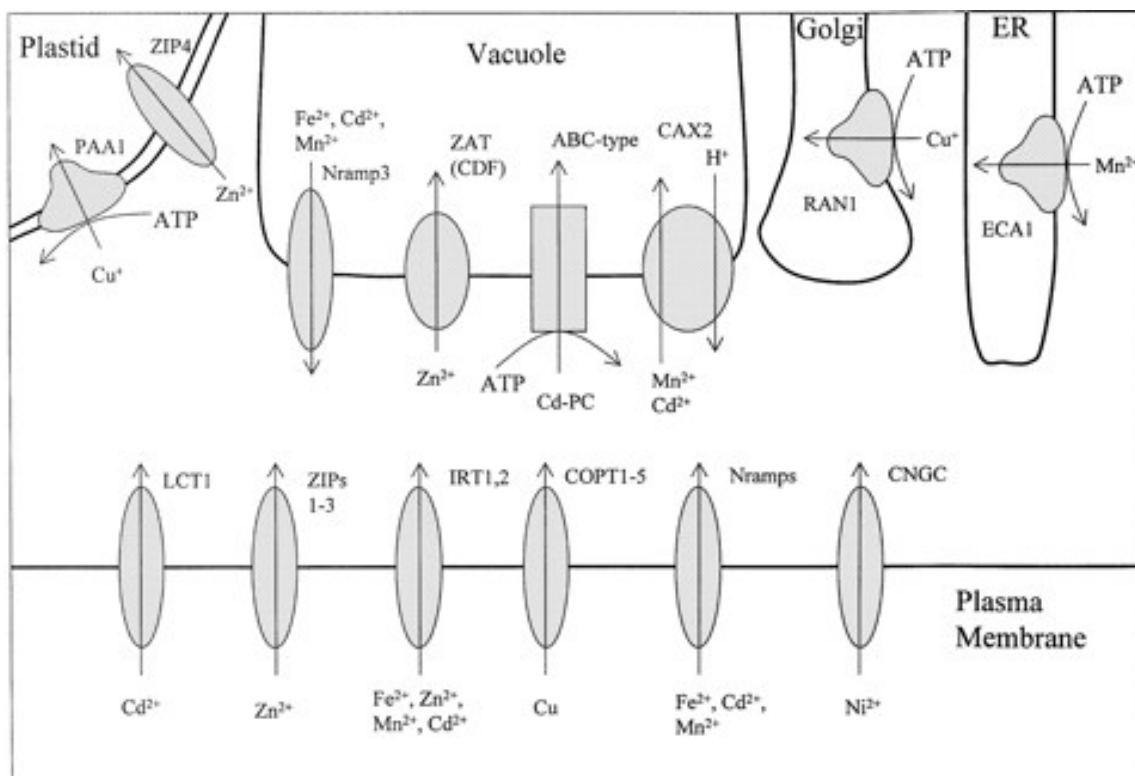


FIGURA 1.1 – Putativi trasportatori di metalli identificati in pianta. La localizzazione di membrana di alcuni di questi trasportatori, soprattutto quelli del plasma lemma deve essere confermata. In particolare il gene *ysl* appartiene alla famiglia degli OPT, mentre il gene *znt* alla famiglia degli ZIP.



FIGURA 2.1 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 a 2 settimane dalla semina, allevate in perlite.



FIGURA 2.2 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 a 3 settimane dalla semina, allevate in perlite.



FIGURA 2.3 – Piante di *S. lycopersicum* cv M82 a 4 settimane dalla semina, allevate in perlite.



FIGURA 2.4 – Piante di *S. lycopersicum* cv M82 di 55 giorni dalla semina, allevate in perlite, al momento del prelievo.



FIGURA 2.5 – Pianta di *S. lycopersicum* cv M82 a 55 giorni dalla semina, allevata in perlite, al momento del prelievo.



FIGURA 2.6 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 dopo 2 settimane dalla germinazione.



FIGURA 2.7 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 dopo 3 settimane dalla germinazione.



FIGURA 2.8 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 dopo 4 settimane dalla germinazione, prima del trasferimento in idroponica.



FIGURA 2.9 – Plantule di *S. lycopersicum* cv M82 dopo 5 settimane dalla germinazione, dopo il trasferimento in idroponica.



FIGURA 2.10 – Pianta di *S. lycopersicum* cv M82 dopo 6 settimane dalla germinazione, allevate in idroponica.



FIGURA 2.11 – Piante di *S. lycopersicum* cv M82 allevate in idroponica .



FIGURA 2.12 – Piante di *S. lycopersicum* IL 6-4 allevate in idroponica



FIGURA 2.13 – Pianta di *S. lycopersicum* IL 6-4 al momento del prelievo, dopo 55 giorni dalla semina.

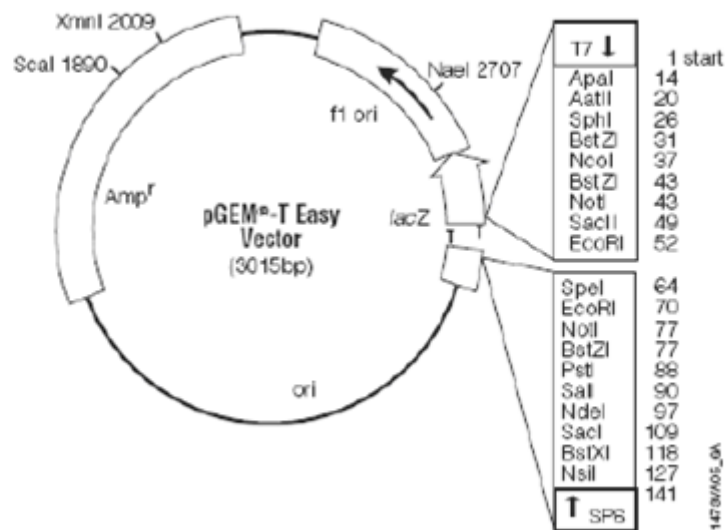


FIGURA 2.14 – Vettore di clonaggio pGEM-T Easy(Promega). I frammenti ottenuti dalle analisi di amplificazione del DNA e del cDNA, previamente adenilati, vengono inseriti nel sito di clonaggio tra i due residui di timina, interrompendo il gene *lac Z*. che contiene al suo interno un gene che conferisce resistenza all'antibiotico ampicillina.



FIGURA 3.1 – Piante di *S. lycopersicum* cv M82 e *S. lycopersicum* IL 6-4 al momento del prelievo.

FIGURA 3.2 – Allineamento di sequenze di *mtp1* di *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi goesingense* e *Arabidopsis thaliana* e *Noccaea fendleri*.

```

b Tg      atggagtccttcaagtcccatca-----tgaggtaatggaggaagatctgat
d Nf      atggagtccttcaagtcccatc-----tgaggtaatggaggaagatctgat
a Tc      atggagtccttcaagtcccatca-----tgaggtaatgtaggaaaacctgat
c At      atggagtccttcaagtccccaccatagtcacattgttgaggtaatgtaggaaaaaccgaa
          *****
b         gaagaaagaagggctgtggcaagttaaagtcctgtggagaggcaccgtgtgggttctcagat
d         gaagaaagaagggctgtggcaagcaaagtcctgtggagaggcaccgtgtgggttctcagat
a         gaagaaagaatacttgcggcaagttaaagtcctgtggagaagctccgtgtgggttctcagat
c         gaagaaagaattattgtggcaagttaaagtcctgtggagaagcgccttgtgggttttcggat
          ***** ** *****
b         gccaaagaatgtttcaggggataccaagaacgcaatgcttctatgcggaagctctgtatc
d         gccaaagaatgcttcaggggatgccaaagaacgcaatgcttctatgcggaagctctgtatc
a         tcgaagaatgcttctggatgccgaggaacgcactgctctatgcgaaagctctgtatc
c         tctaagaatgcttcggagatgctcaggaacgctctgcttctatgcggaagcttctgtatc
          * ***** ** * *****
b         gcggtgggtgttatgtcttgtgttcattgagcgttgaaatcgttggtggaatcaaagccaat
d         gcggtgggtgttgtgtcttgtgttcattgacggttgaaatcgttggtggaatcaaagccaat
a         gcggtgggtgttatgtcttattgttcattgagcgttgaaatcgttggtggcattaaagccaat
c         gcggtcgtgctgtgtctatgtgttcattgagcgttgaaatcgttggtggcattaaagccaat
          ***** ** * *****
b         agtttggctataatgacagatgcagcacatttgctctctgacgttgctgcctttgccatc
d         agtttggctataatgacagatgcagcacatttgctctctgacgttgctgcctttgccatc
a         agtttggcattcttaccgatgcagcacatttgctctctgacgttgctgcctttgccatc
c         agtttggccatattaaccgatgctgctcatttgctctctgacgttgctgcctttgctatc
          ***** ** * ** *****
b         tctctcttcgccttgtgggctgctggttggaagcgacgagcagacttacgggttc
d         tcgctcttctccttgtgggctgctggttggaagccacgagcagacttacgggttc
a         tccttgttctccctgtgggctgctggttggaagcgactccgagcagacttatgggttc
c         tcctctcttctcattgtgggctgctggttggaagcgactccagcagacttacgggttc
          ** * ** * *****
b         ttcaggattgagatcttgggagctcttgtgtctatccagctcatttgggtgcttactggg
d         ttcaggattgagatcttgggagctcttgtgtctatccagctcatttgggtgcttactggg
a         ttcaggatcgagattctcgagctcttgtatctatccagctcatttgggtgctcaccggg
c         ttcaggattgagatttgggagctcttgtgtctatccagctcatttgggtgctcaccggg
          ***** ** * *****
b         atcttgggttatgaagccatatcaaggcttcttaccgagaccagtgaggtaatggattc
d         atcttgggttatgaagccatcataaggcttcttaccgagaccggtgagggtgatggattc
a         attttgggtgatgaagccattagcagacttctcaccgagaccagtgaggtaatggattc

```


** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

b gggacaacccatcaacatgattcgaaacattcttgaagtgttgatggagagtacgcctaga
d gggacaacccatcaacatgattcgaaagcattcttgaagtgttgatggagagtacgcctaga
a ggaacaacccatcaacatgatccgaagcatccttgaagtattgatggagagtaccccaga
c ggaacaacccatcaacatgattcgaaacattctagaagtattgatggagagtaccccaga
** ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

b gagattgacgctacaaagctcgaaaagggtttgctcgaaatggaaggagtgggtggctgtt
d gagattgacgctacgaagctcgaaaagggtttgctcgaaatggaagaagtgggtggctgtt
a gaggttgacgctacgaaactggaagagggtttgctcgaaatggaagaagtgggtggctgtt
c gagattgacgccacaaagctcgaaaagggtctgcttgaaatggaagaagtgggtggctgtt
*** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

b catgagcttcacatttgggctatcacagtgggaaagggttttacttgcttgccatgtcaat
d catgagcttcacatttgggctatcacagtgggaaagggttttacttgcttgccatgtcaat
a catgagcttcacatttgggctatcacagtgggaaagggttttacttgcttgccatgtcaat
c catgagcttcacatttgggctatcacagtgggaaagggtctattggcttgccatgtcaat
***** ** * ** * ** * ** * ** *

b gttacaccacaagcagatgcagatatggtgctcaacaagggtggttgattacatccgcaga
d gctagaccagaagcagatgcagatatggtgctcaacaagggtggttgattacatccgtaga
a atcagaccagaagcagatgcagatatggttctgaacaagggtcattgattacatccgcagg
c atcagaccagaagcagatgcagacatggtgctcaacaaggtaattgattacatccgcagg
* ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

b gagtacaatatcagtcatgtaaccatacaaatcgagcgctaa
d gagtacaatatcagtcacgtcacatacaaatcgagcgctaa
a gagtacaatatcagtcacgtcacatacaaatcgagcgctaa
c gagtacaacattagtcatgttacgatacaaatcgagcgctaa
***** ** * ** * ** * ** * ** *

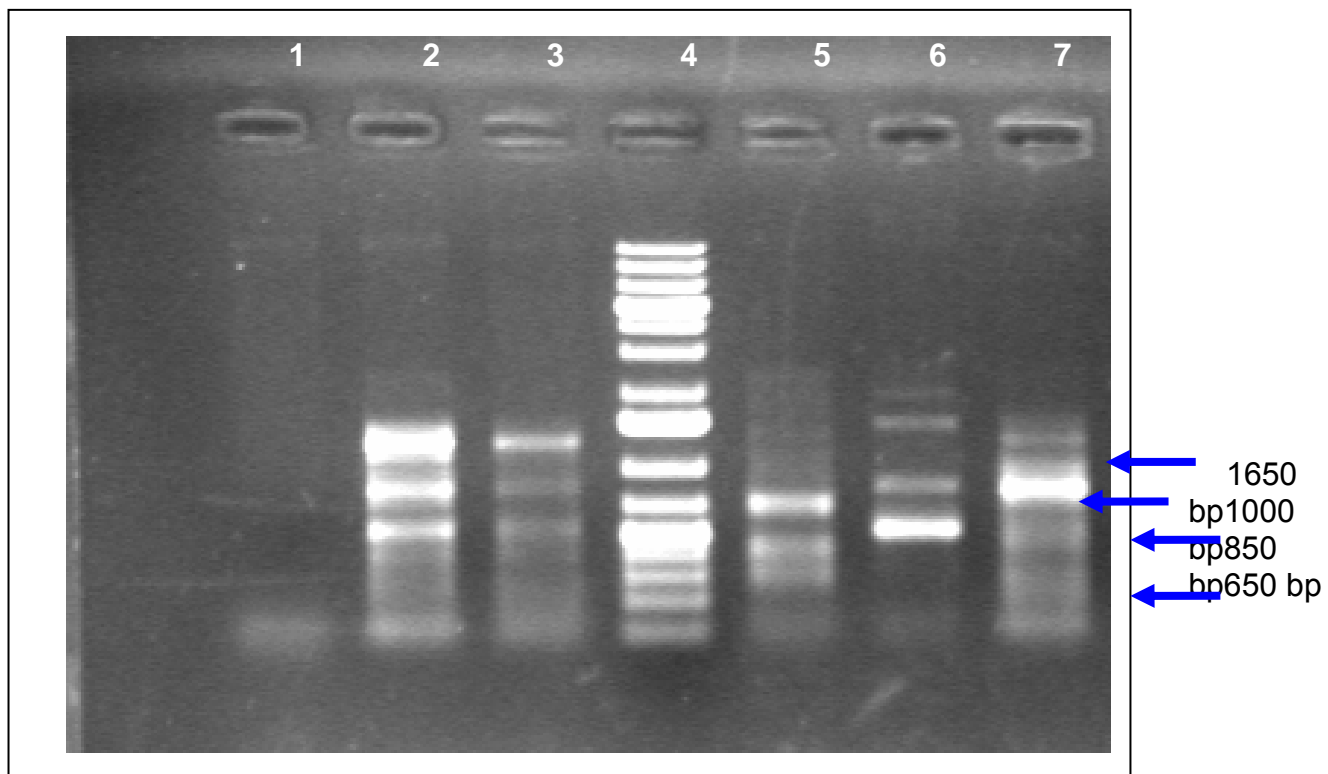


FIGURA 3.3 – Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con i primer 205-208 del gene *ysl* su DNA genomico di varie specie vegetali. Nella linea 1 è presente il prodotto di reazione senza DNA, nella linea 2 l'amplicone di *S. lycopersicum*, nella linea 3 di *A. thaliana*, nella linea 4 il Marker 1kb, nella linea 5 l'amplicone di *N. tabacum*, nella linea 6 di *Phalaris canariensis* e nella linea 7 di *Cicer arietinum*.

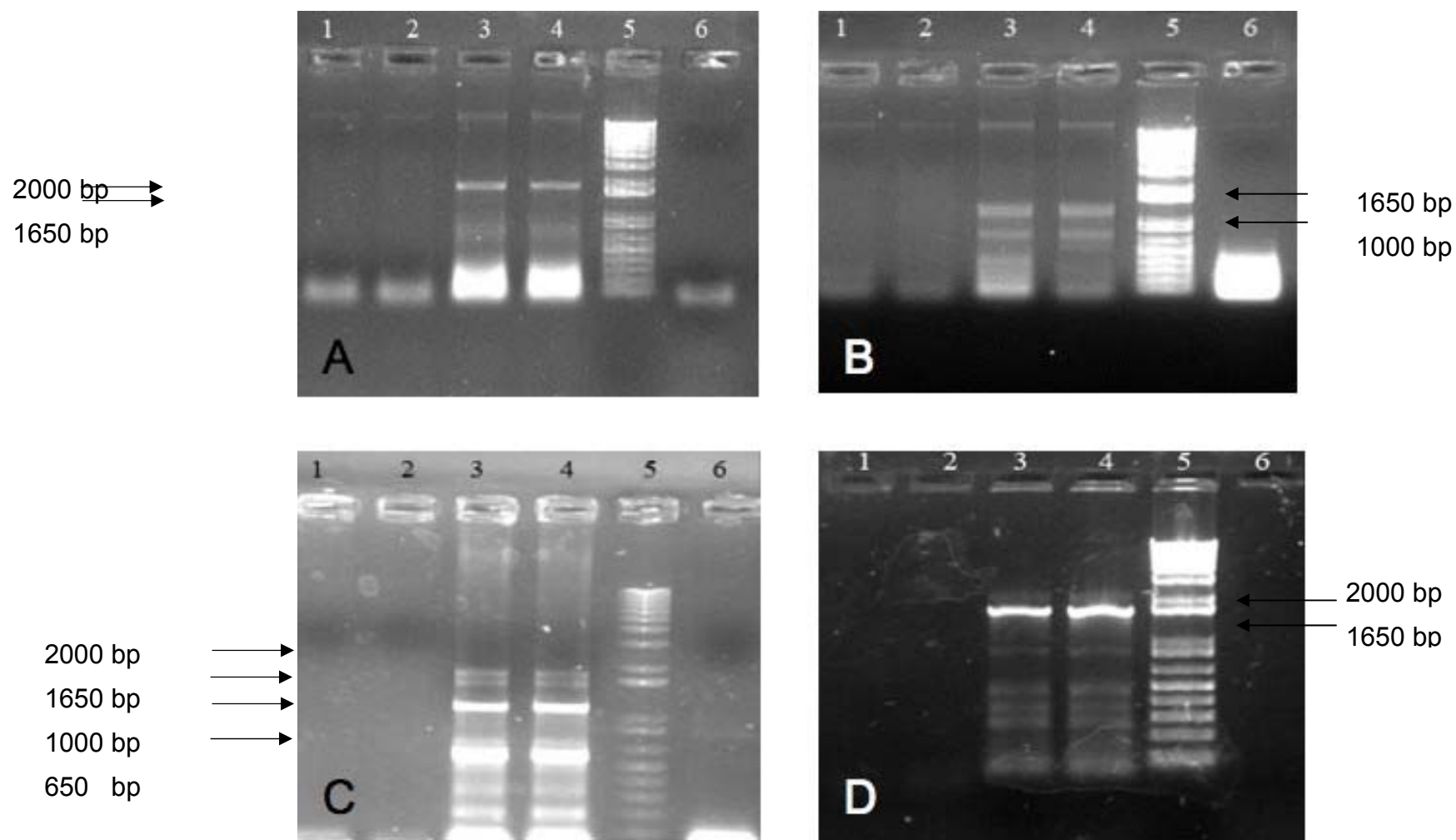


FIGURA 3.4 – Pannello A: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione *in vitro* con i primer 217- 218 del gene *znt*; pannello B: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione *in vitro* con i primer 206-207 del gene *ysl*; pannello C: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione *in vitro* con i primer 213-216 del gene *nramp*; pannello D: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione *in vitro* con i primer 209-212 del gene *hma*. Per ciascun pannello nelle linee 1 e 2 sono presenti gli ampliconi del genotipo *S. pennellii*, nelle linee 3 e 4 gli ampliconi del genotipo *S. lycopersicum* cvM82 e nelle linee 5 e 6 sono presenti rispettivamente il Marker 1Kb e il prodotto della reazione senza DNA.

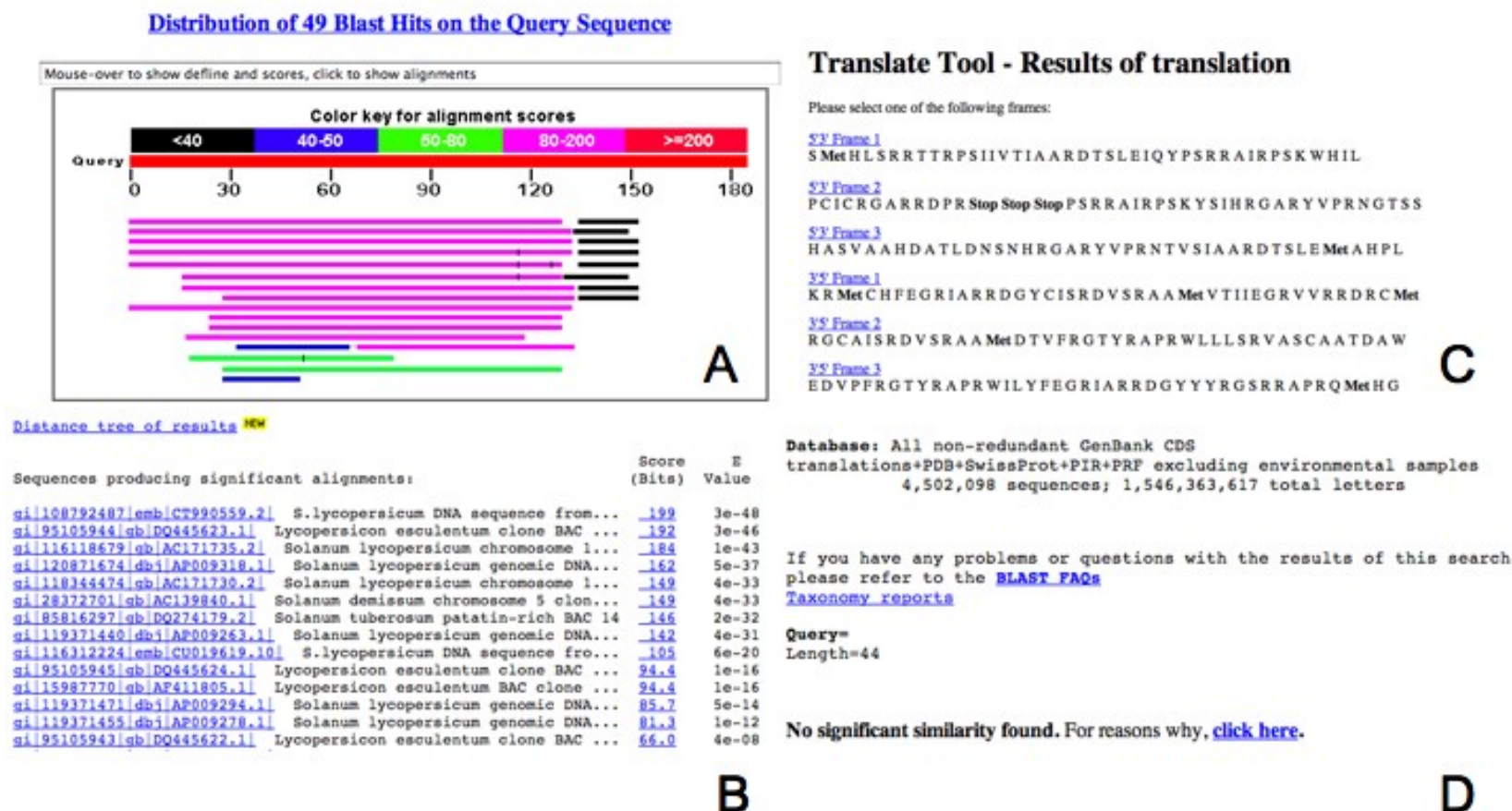


FIGURA 3.5 – Analisi *in silico* della sequenza *ysl* di *S.lycopersicum*. Nel pannello A è rappresentato la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati; nel pannello B è mostrato che essa non risulta essere una regione codificante del genoma di pomodoro; nel pannello C è mostrata la traduzione *in silico*; nel pannello D si nota che nessuno dei 6 possibili frame di lettura è risultato codificante per alcun peptide riconosciuto in banca dati.

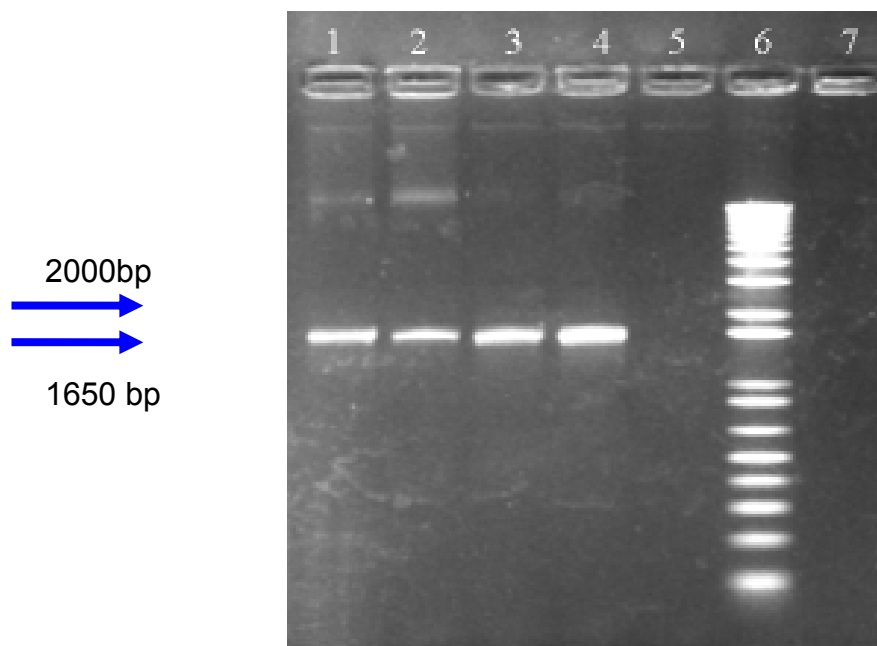


FIGURA 3.6. Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con primer 264 e 265 del gene *ysl*; nelle linee 1 e 2 è presente il DNA di *S. lycopersicum* cv M82, nelle linee 3 e 4 è presente il DNA *S. pennellii*, nella linea 5 è presente il prodotto della reazione senza DNA e nella linea 6 è presente il Marker 1Kb.

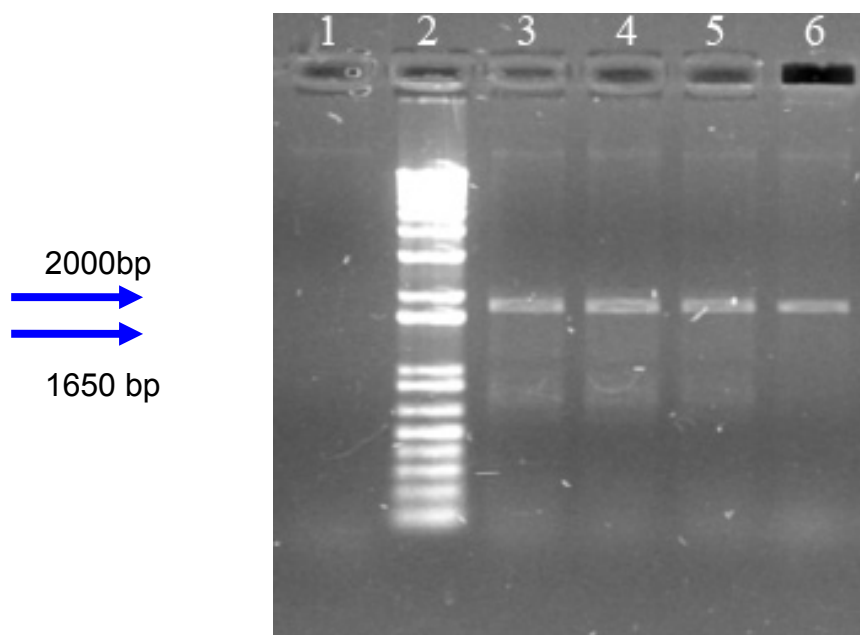


FIGURA 3.7 – Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con primer 262 e 263 del gene *znt*; nelle linee 1 e 2 è presente il DNA di *S. lycopersicum* cv M82, nelle linee 3 e 4 è presente il DNA *S. pennellii* , nella linea 5 è presente il prodotto della reazione senza DNA e nella linea 6 è presente il Marker 1Kb.

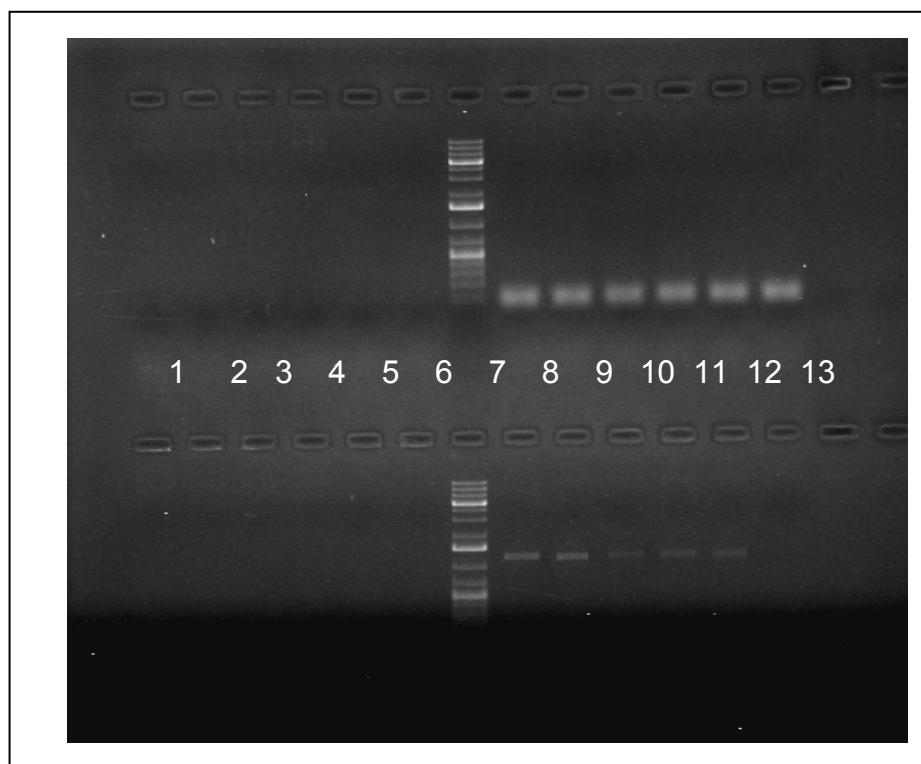


FIGURA 3.9 – Pannello superiore: linee 1-5: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con i primer ysl 326-327 su DNA di Money Maker, *S. habrocaites*, *S. lycopersicum* cv M82, ecotipo S. Marzano e *S. pennellii*; linea 6: controllo negativo; linea 7, Marker 1Kb; linee 8-12: analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con primer 332-333 su DNA di Money Maker, *S. habrocaites*, M82, tipo S. Marzano e *S. pennellii*; linea 13 controllo negativo.

Pannello inferiore: linee1-5: Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con primer 326-333 su DNA di Money Maker, *S. habrocaites*, *S. lycopersicum* cv M82, ecotipo S. Marzano e *S. pennellii*; linea 6: controllo negativo; linea 7, Marker 1Kb; linee 8-12 analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con primer 327-332 su DNA di Money Maker, *S. habrocaites*, M82, tipo S. Marzano e *S. pennellii*; linea 13, controllo negativo

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
1 MMys1	1211	2 M82ys1	1197	98
1 MMys1	1211	3 SMys1	1200	98
2 M82ys1	1197	3 SMys1	1200	98

M82ys1	GATAGGCTAAAATAGAAAGTCTTTTTCTTAATAAGCCAAAAGTACAAGTTTCATTTTAAA	172
SMys1	GATAGGCTAAAATAGAAAGTCTTTTTCTTAATAAGCCAAAAGTACAAGTTTCATTTTAAA	170
MMys1	GATAGGCTAAAATAGAAAGTCTTTTTCTTAATAAGCCAAAAGTACAAGTTTCATTTTAAA	180

M82ys1	AAAATCATTCTGAAATAATCGACAAATAAAAGTGAACGGAGAAAGTGATATTTTAACTA	232
SMys1	AAAATCATTCTGAAATAATCGACAAATAAAAGTGAACGGAGAAAGTGATATTTTAACTA	230
MMys1	AAAATCATTCTGAAATAATCGACAAATAAAAGTGAACGGAGAAAGTGATATTTTAACTA	240

M82ys1	TAAAATATCTTTTTCTTAAATAAATAAATTATAGACACACAAATATAAAATATCTACAA	292
SMys1	TAAAATATCTTTTTCTTAAATAAATAAATTATAGACACACAAATATAAAATATCTACAA	290
MMys1	TAAAATATCTTTTTCTTAAATAAATAAATTATAGACACACAAATATAAAATATCTACAA	300

M82ys1	CTTATTTTTTTAATTATAATTTTCAAAGGTTTTTTTCAACCCTATGCAAGGCATAAAATC	352
SMys1	CTTATTTTTTTAATTATAATTTTCAAAGGTTTTTTTCAACCCTATGCAAGGCATAAAATC	350
MMys1	CTTATTTTTTTAATTATAATTTTCAAAGGTTTTTTTCAACCCTATGCAAGGCATAAAATC	360

M82ys1	TCCAAAAGAGGGAGTAAATAATATTTATTGCTATTGTTTCATAGGACATTCACAAACCTTT	412
SMys1	TCCAAAAGAGGGAGTAAATAATATTTATTGCTATTGTTTCATAGGACATTCACAAACCTTT	410
MMys1	TCCAAAAGAGGGAGTAAATAATATTTATTGCTATTGTTTCATAGGACATTCACAAACCTTT	420

FIGURA 3.10 – Multiallineamento tra sequenze parziali del gene *ysI* ottenute dalla amplificazione *in vitro* con i primer 327-332 su DNA di *S. lycopersicum* cv M82, *S. lycopersicum* S. Marzano, Money Maker, *S. pennellii* e *S. habrocaites*.

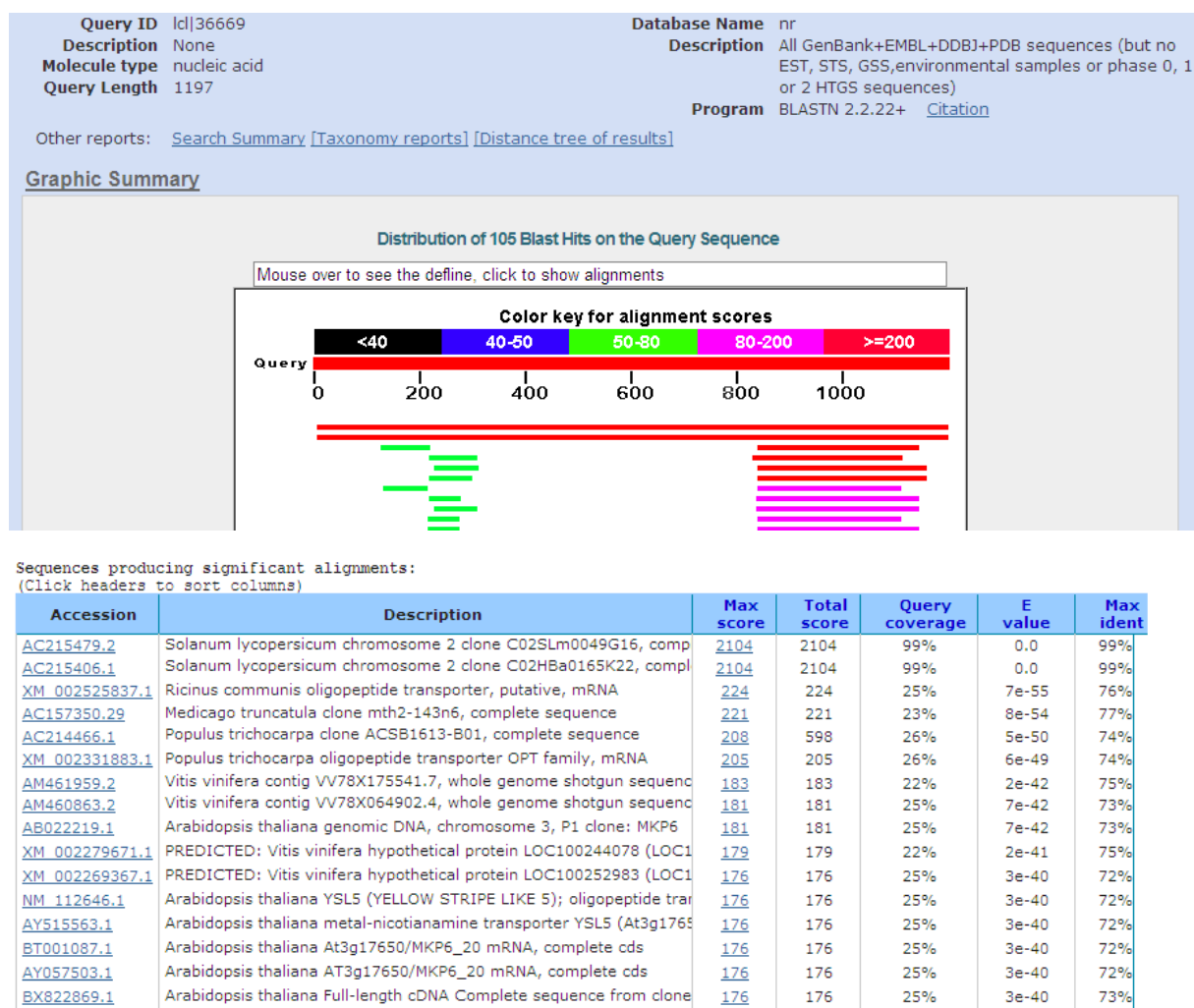


FIGURA 3.11 – Analisi *in silico* della sequenza di *S.lycopersicum* cv M82 ottenuta con i primer 327 e 332 del gene *ysl*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *ysl* in altre specie.

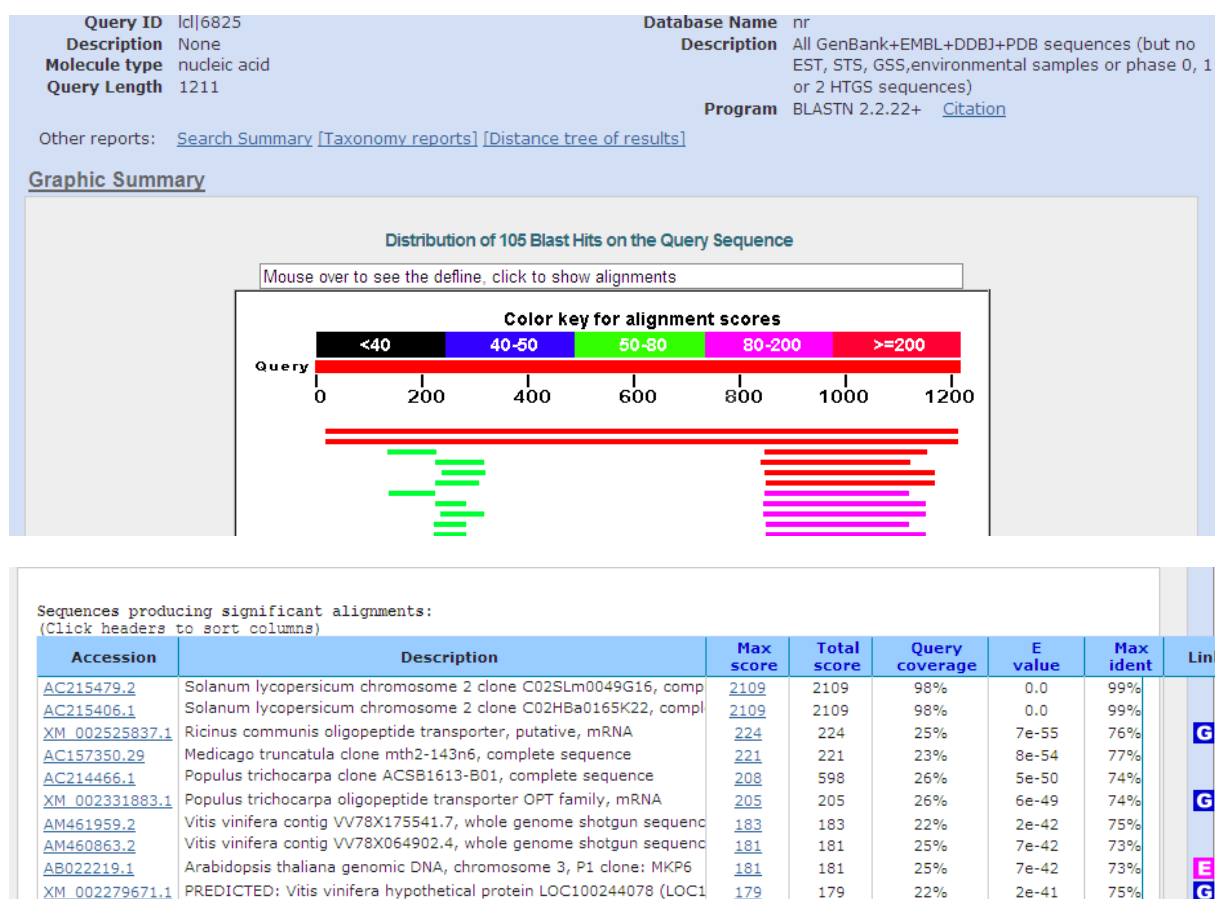


FIGURA 3.12 – Analisi *in silico* della sequenza di Money Maker ottenuta con i primer 327 e 332 del gene *ysl*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *ysl* in altre specie.

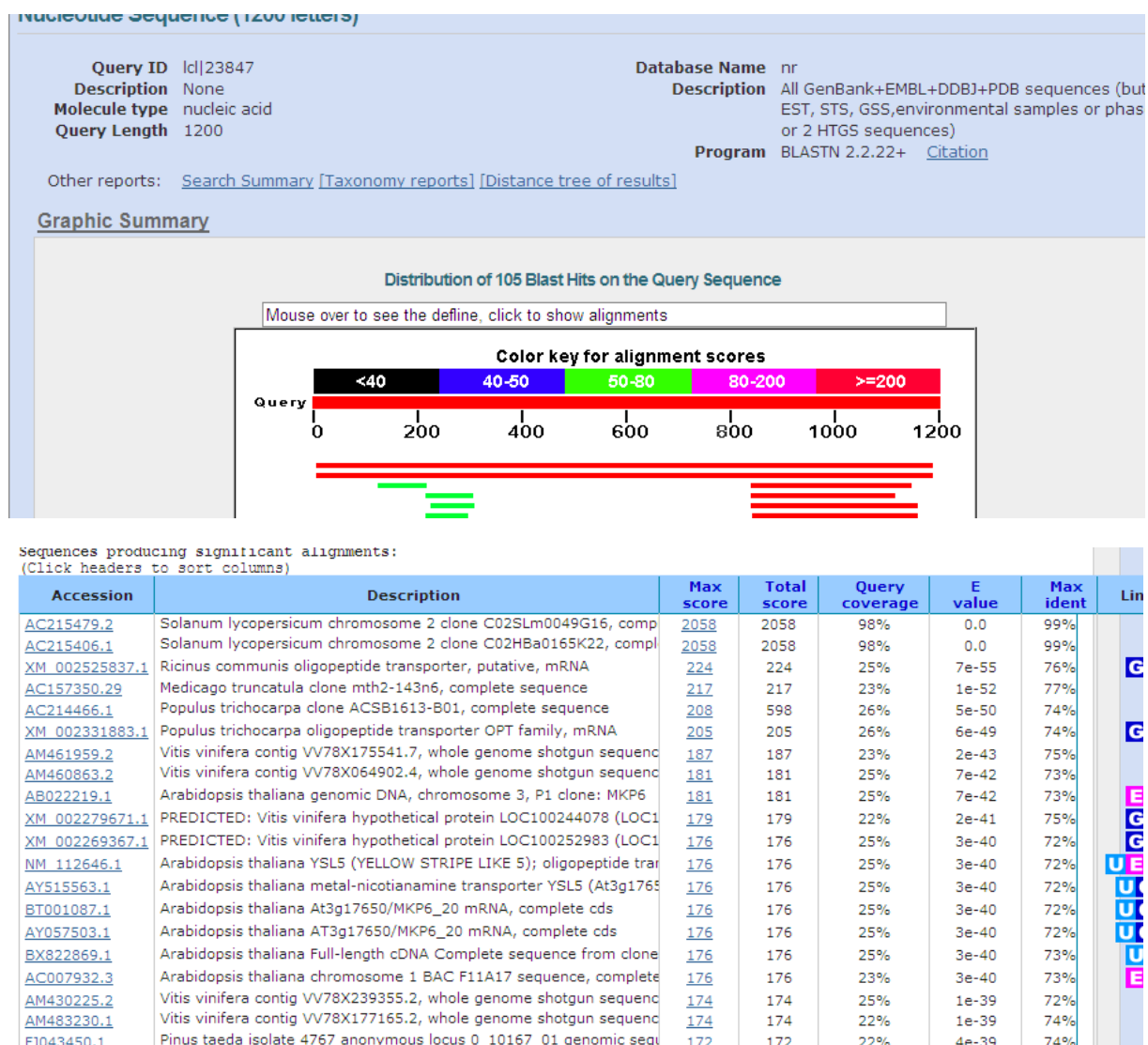


FIGURA 3.13 – Analisi *in silico* della sequenza di *S.lycopersicum*, ecotipo San Marzano, selezione 6 ottenuta con i primer 327 e 332 del gene *ysl*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *ysl* in altre specie.

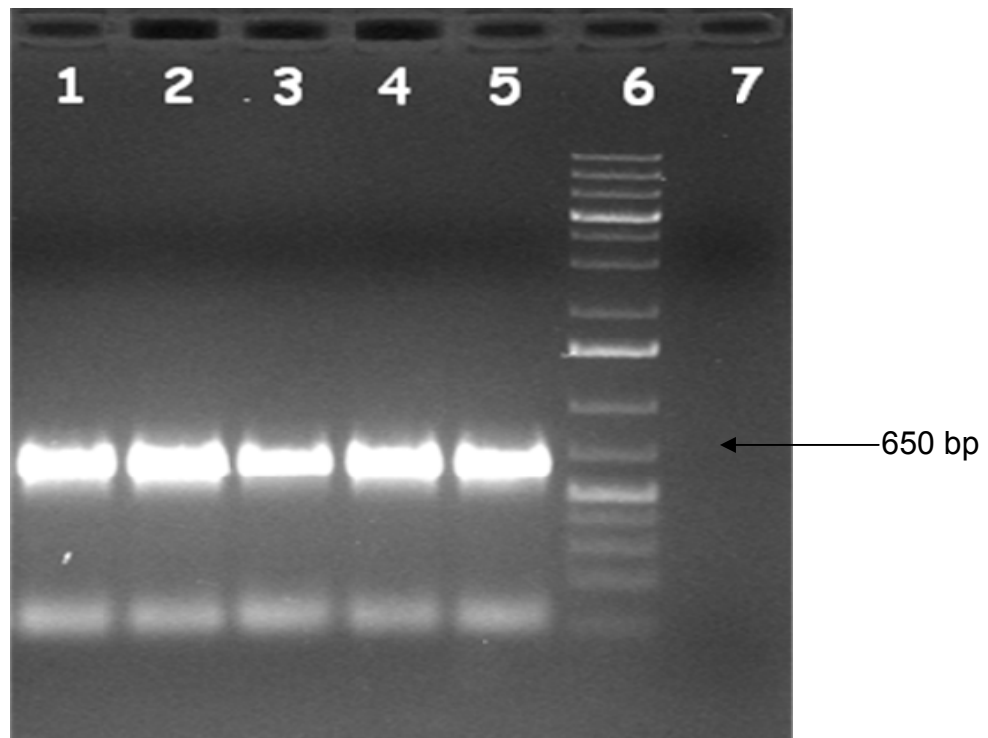


FIGURA 3.14 – Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con i primer 318-31 del gene *hma*; nelle linee da 1 a 5 è presente il DNA di *S. lycopersicum* cvM82, *S. pennellii*, *S. habrocaites*, Money Maker, *S. lycopersicum*, ecotipo S. Marzano, selezione 6; nella linea 6 è presente il Marker 1Kb;nella linea 7 è presente il prodotto di reazione senza DNA..

```

penn_319rev+318      AGAAAGATCGATTGCTGTTATTACATCTTTCAAGCTGCTTTTCATAAGAACAAATGTCAGC 240
habr_319rev+318      AGAAAGATCAATTGCTGTTATTACATCTTTCAAGCTGCTTTTCATAAGAACAAATGTCAGC 240
s.marzano_319rev+318 AGAAAGATCGATTGCTGTTATTACATCTTTCAAGCTGCTTTTCATAAGAACAAATGTCAGC 240
m82_319rev+318       AGAAAGATCGATTGCTGTTATTACATCTTTCAAGCTGCTTTTCATAAGAACAAATGTCAGC 240
mm_318               AGAAAGATCGATTGCTGTTATTACATCTTTCAAGCTGCTTTTCATAAGAACAAATGTCAGC 236
*****

penn_319rev+318      TGCCTCGATTGCTATACTGTGCTGACACCGATTGCTATTCCCTACATCAGCAGCCACAAG 300
habr_319rev+318      TGCCTCGATTGCTATACTGTGCTGACACCGATTGCTATTCCCTACATCAGCAGCCACAAG 300
s.marzano_319rev+318 TGCCTCGATTGCTATACTGTGCTGACACCGATTGCTATTCCCTACATCAGCAGCCACAAG 300
m82_319rev+318       TGCCTCGATTGCTATACTGTGCTGACACCGATTGCTATTCCCTACATCAGCAGCCACAAG 300
mm_318               TGCCTCGATTGCTATACTGTGCTGACACCGATTGCTATTCCCTACATCAGCAGCCACAAG 296
*****

penn_319rev+318      TGCTGGTGAGTCATTAACTCCATCTCCTACCATGCCCACAACTTTGCCTAAATCCTGTGT 360
habr_319rev+318      TGCTGGTGAGTCATTAACTCCATCTCCTACCATGCCCACAACTTTGCCTAAATCCTGTGT 360
s.marzano_319rev+318 TGCTGGTGAGTCATTAACTCCATCTCCTACCATGCCCACAACTTTGCCTAAATCCTGTGT 360
m82_319rev+318       TGCTGGTGAGTCATTAACTCCATCTCCTACCATGCCCACAACTTTGCCTAAATCCTGTGT 360
mm_318               TGCTGGTGAGTCATTAACTCCATCTCCTACCATGCCCACAACTTTGCCTAAATCCTGTGT 356
*****

penn_319rev+318      ACTAAATGGAACAGATGAATCATGTGAAGAAATGTAACATTACACATCAAAGACTAT 420
habr_319rev+318      ACTAAATGGAACAGATGAATCATGTGAAGAAATGTAACATTACACATCAAAGACTAT 420
s.marzano_319rev+318 ACTAAATGGAACAGATGAATCATGTGAAGAAATGTAACATTACACATCAAAGACTAT 420
m82_319rev+318       ACTAAATGGAACAGATGAATCATGTGAAGAAATGTAACATTACACATCAAAGACTAT 420
mm_318               ACTAAATGGAACAGATGAATCATGTGAAGAAATGTAACATTACACATCAAAGACTAT 416
*****

```

Scores Table

SeqA Name	Len (nt)	SeqB Name	Len (nt)	Score
1 m82_319rev+318	492	2 penn_319rev+318	520	97
1 m82_319rev+318	492	3 habr_319rev+318	520	96
1 m82_319rev+318	492	4 s.marzano_319rev+318	493	97
1 m82_319rev+318	492	5 mm_318	486	97
2 penn_319rev+318	520	3 habr_319rev+318	520	98
2 penn_319rev+318	520	4 s.marzano_319rev+318	493	99
2 penn_319rev+318	520	5 mm_318	486	97
3 habr_319rev+318	520	4 s.marzano_319rev+318	493	98
3 habr_319rev+318	520	5 mm_318	486	97
4 s.marzano_319rev+318	493	5 mm_318	486	98

FIGURA 3.15 – Multiallineamento tra sequenze parziali del gene *hma* ottenute dalla amplificazione *in vitro* con i primer 318-319 su DNA di *S. lycopersicum* cv M82, *S. lycopersicum* S. Marzano, Money Maker, *S. pennellii* e *S. habrocaites*.

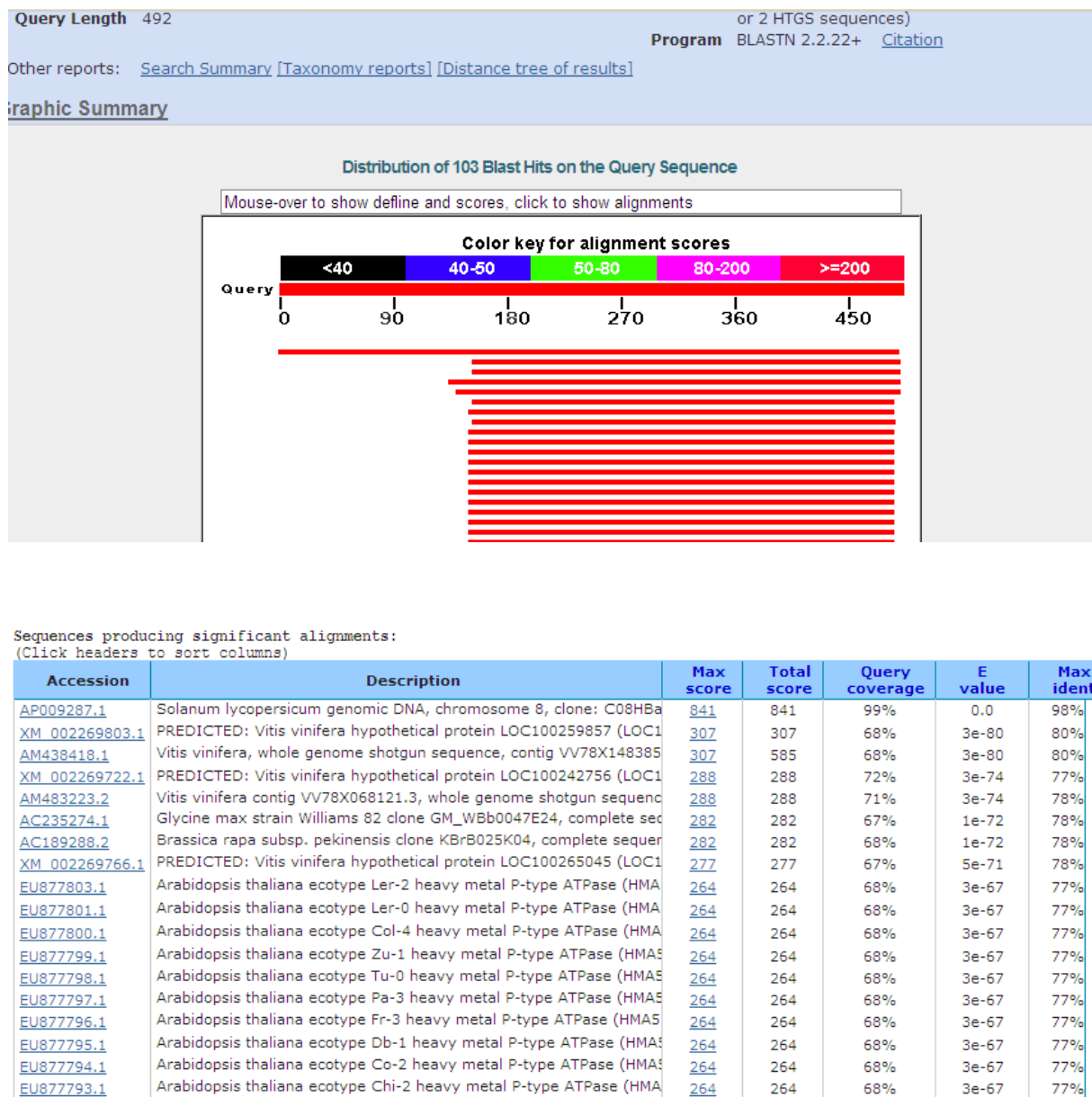


FIGURA 3.16 – Analisi *in silico* della sequenza di *S.lycopersicum* cv M82 ottenuta con i primer 318 e 319 del gene *hma*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

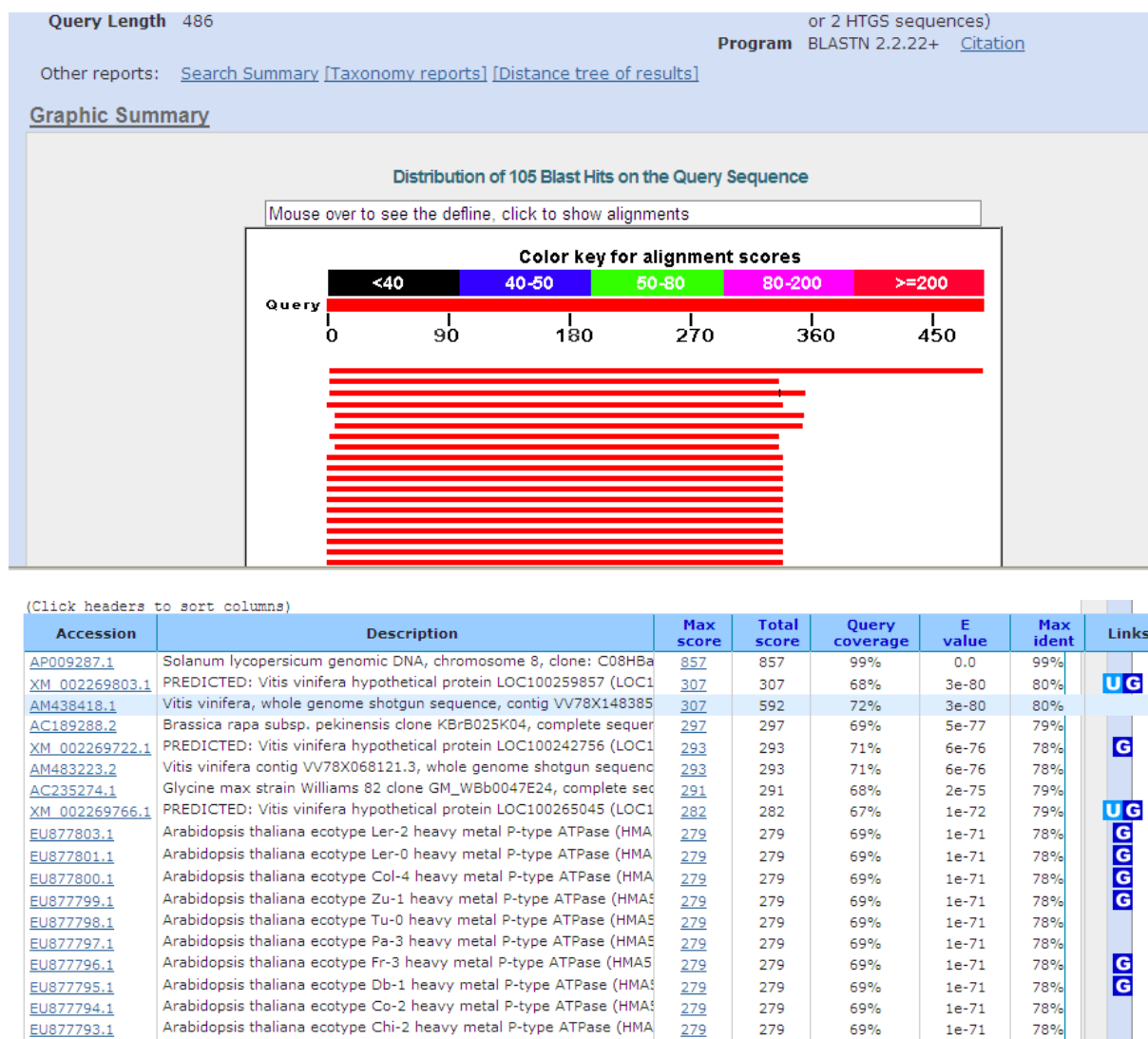


FIGURA 3.17 – Analisi *in silico* della sequenza di Money Maker ottenuta con i primer 318 e 319 del gene *hma*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

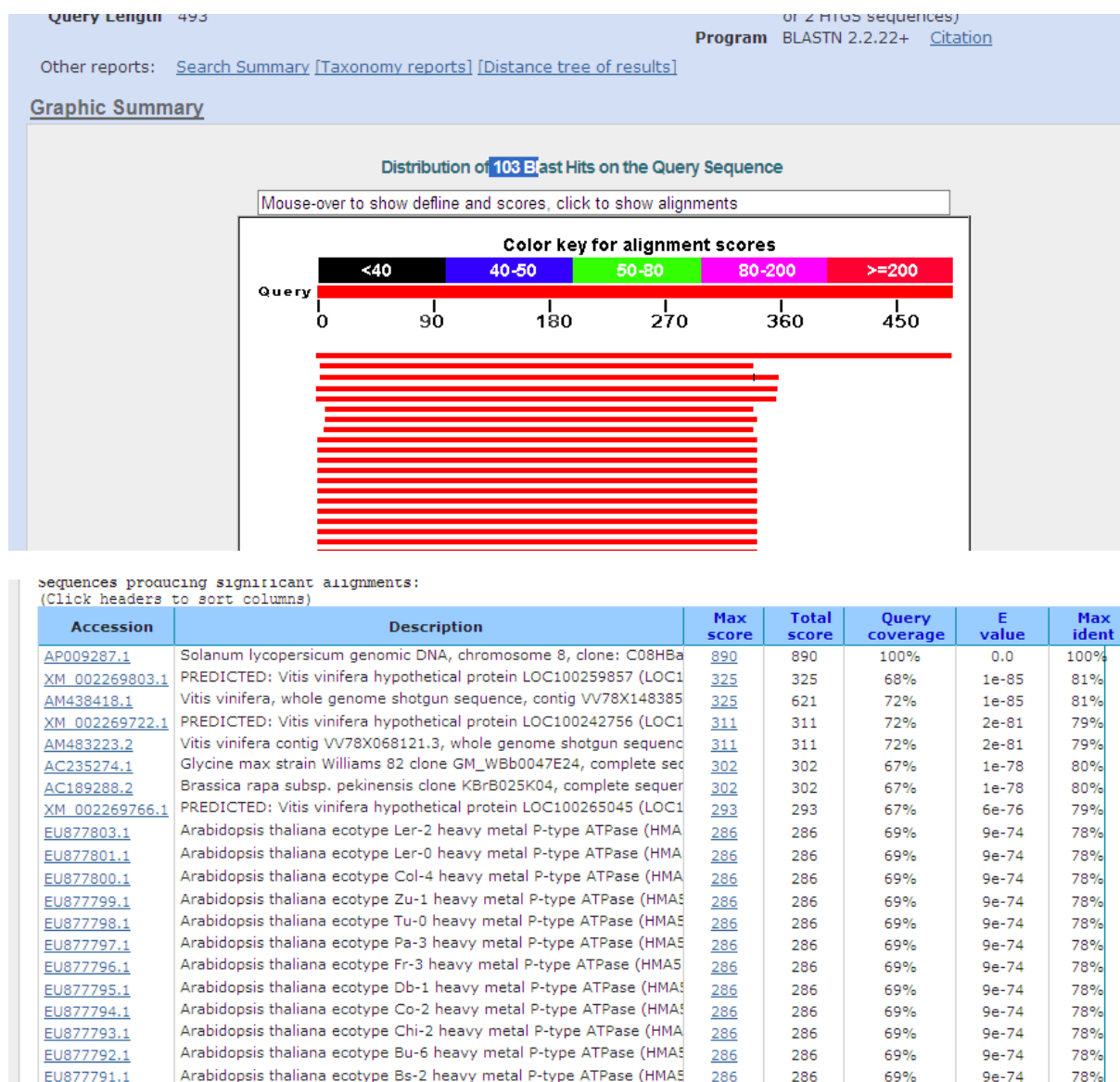


FIGURA 3.18 – Analisi *in silico* della sequenza di *S.lycopersicum*, ecotipo San Marzano, selezione 6, ottenuta con i primer 318 e 319 del gene *hma*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

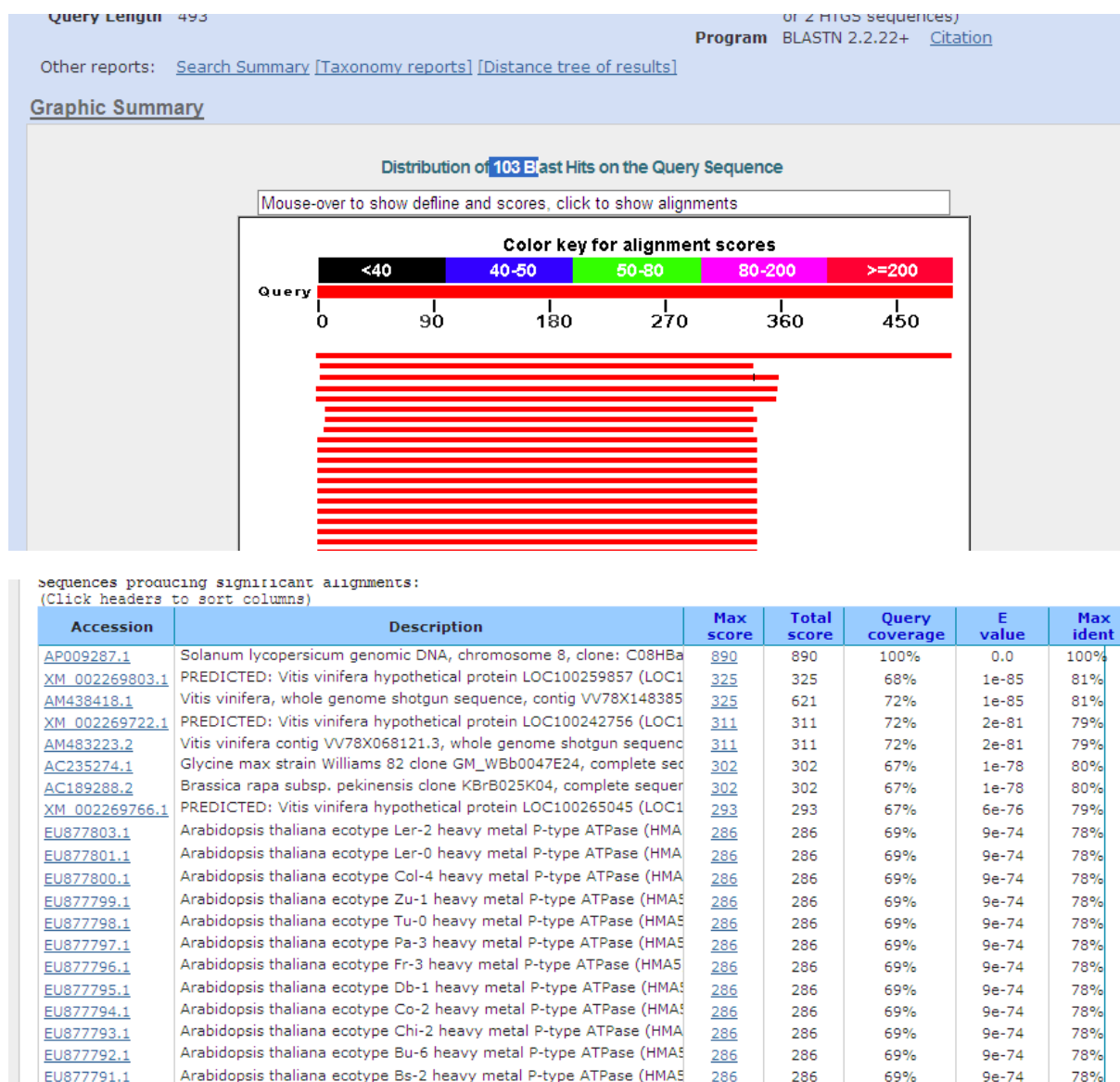


FIGURA 3.19 – Analisi *in silico* della sequenza di *S. pennellii* ottenuta con i primer 318 e 319 del gene *hma*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

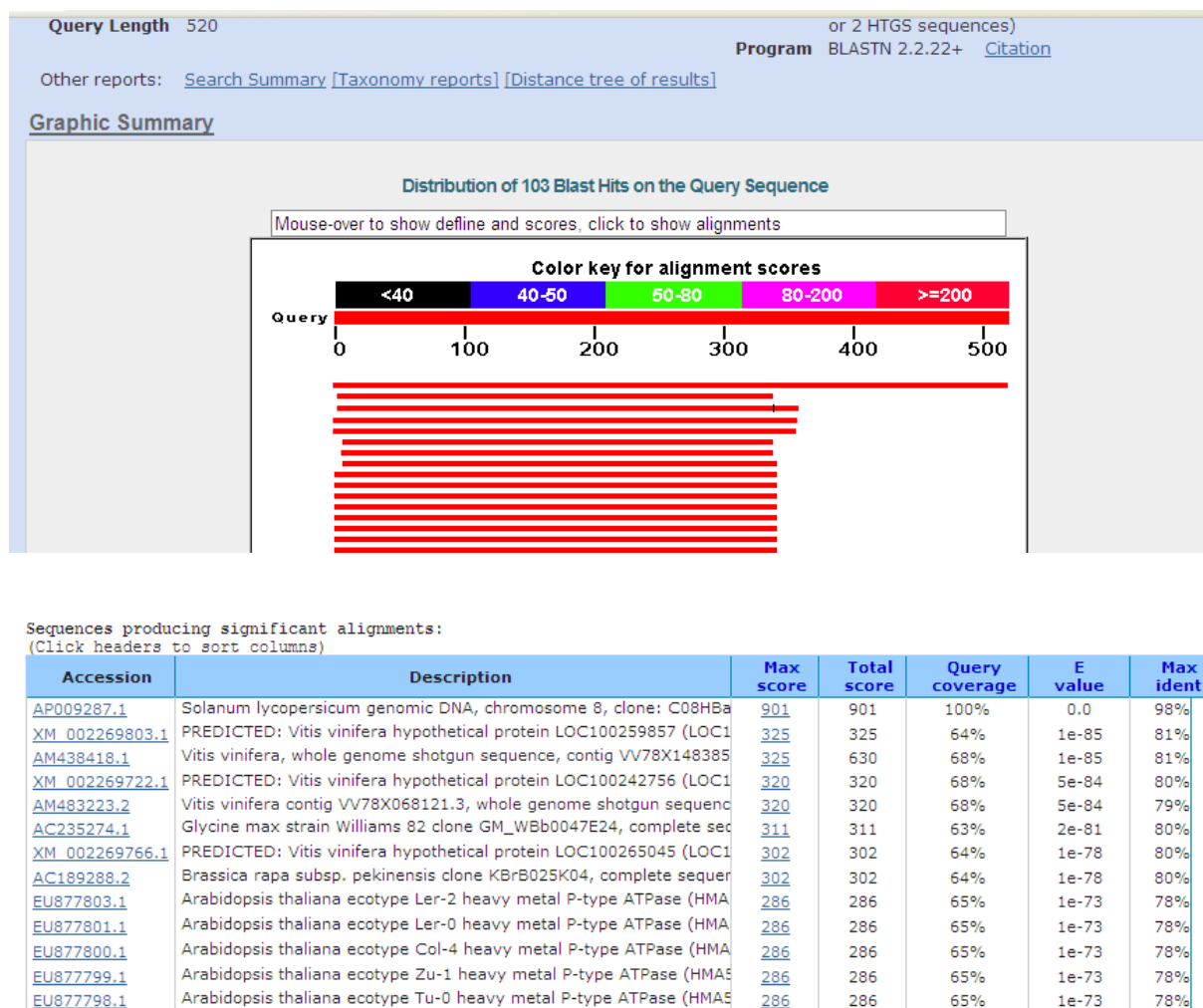


FIGURA 3.20 – Analisi *in silico* della sequenza di *S.habrocaites* ottenuta con i primer 318 e 319 del gene *hma*. Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

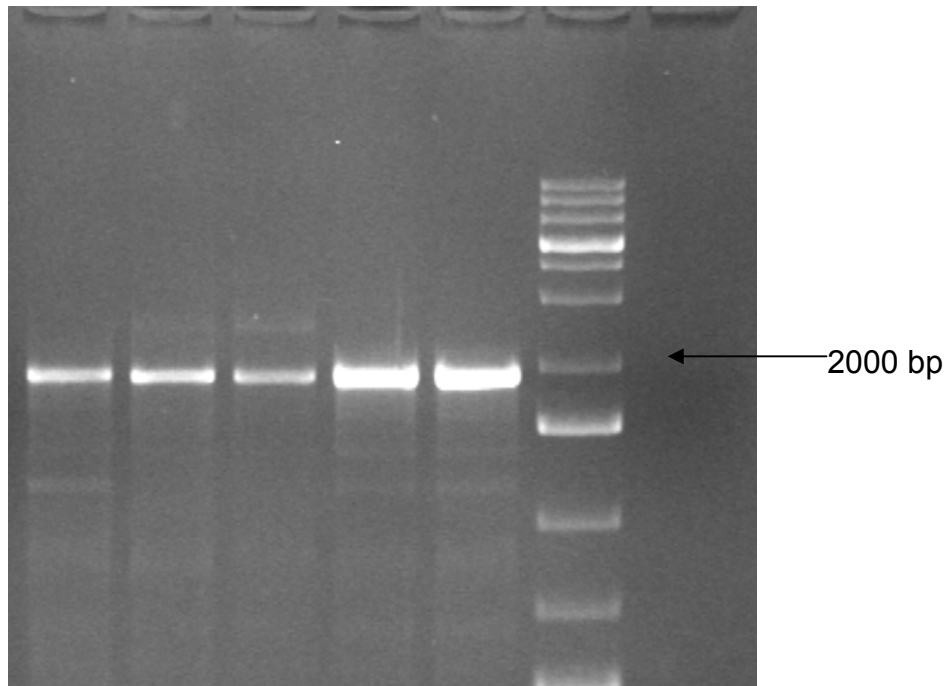


FIGURA 3.21 – Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione con i primer *hma* 317-318 su DNA di *S. lycopersicum* cvM82 (linea 1), *S. pennellii* (linea 2), *S. habrocaites* (linea 3), Money Maker (linea 4), ecotipo *S.* Marzano (linea 5) ; Marker 1Kb (linea 6); prodotto di reazione senza DNA (linea 7).

(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AP009287.1	Solanum lycopersicum genomic DNA, chromosome 8, clone: C08HBa	679	679	100%	0.0	98%
XM_002269803.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100259857 (LOC1	325	325	90%	8e-86	80%
AM438418.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X148385	325	622	95%	8e-86	80%
XM_002269722.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100242756 (LOC1	315	315	94%	1e-82	79%
AM483223.2	Vitis vinifera contig VV78X068121.3, whole genome shotgun sequenc	315	315	94%	1e-82	79%
AC189288.2	Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrB025K04, complete sequer	313	313	91%	5e-82	79%
AC235274.1	Glycine max strain Williams 82 clone GM_WBb0047E24, complete sec	304	304	86%	3e-79	80%
XM_002269766.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100265045 (LOC1	295	295	90%	1e-76	78%
EU877803.1	Arabidopsis thaliana ecotype Ler-2 heavy metal P-type ATPase (HMA	295	295	91%	1e-76	78%
EU877801.1	Arabidopsis thaliana ecotype Ler-0 heavy metal P-type ATPase (HMA	295	295	91%	1e-76	78%
EU877800.1	Arabidopsis thaliana ecotype Col-4 heavy metal P-type ATPase (HMA	295	295	91%	1e-76	78%
EU877799.1	Arabidopsis thaliana ecotype Zu-1 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877798.1	Arabidopsis thaliana ecotype Tu-0 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877797.1	Arabidopsis thaliana ecotype Pa-3 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877796.1	Arabidopsis thaliana ecotype Fr-3 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877795.1	Arabidopsis thaliana ecotype Db-1 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877794.1	Arabidopsis thaliana ecotype Co-2 heavy metal P-type ATPase (HMA5	295	295	91%	1e-76	78%
EU877793.1	Arabidopsis thaliana ecotype Chi-2 heavy metal P-type ATPase (HMA	295	295	91%	1e-76	78%

FIGURA3.22 – Analisi *in silico* della sequenza di *S. pennellii* ottenuta con i primer 317 e 318 del gene *hma* Nel pannello in alto è rappresentata la percentuale di allineamento tra la sequenza in questione e quelle presenti in banca dati, nel pannello in basso è rappresentata la percentuale di identità con le sequenze codificanti per *hma* in altre specie.

7. BIBLIOGRAFIA

- Andres-Colas N., Sancenon V., Rodriguez-navarro S., Mayo S., Thiele D.J., Ecker J.R., Puig S., Penarrubia L., 2006.** The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and function in copper detoxification of roots. *Plant J.*, 45: 225-236.
- Aromolo R., Benedetti A., Fiorelli F., Francaviglia R., Gataleta R., Marchionni M., Arduini I., Douglas L., Onnis G., 1996.** Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97: 111-117.
- Arumuganathan K., Earle E.D., 1991.** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep*, 9: 208-218.
- Bai Y., Lindhout P., 2007.** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany*, 100: 1085-1094.
- Bargagli R., 1998a.** Chemical elements and plants life. *Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*, 1-21.
- Bargagli R. 1998b.** Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. *Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*, 207-236.
- Bereczky J., 2003.** "Differential Regulation of *nramp* and *irt* Metal Transporter Genes in Wild Type and Iron Uptake Mutants of Tomato", *The journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 27, Issue of July 4, pp. 24697–24704.
- Bostein D., Skolnick M., Davis R.W., 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction length polymorphism. *Ann. J Hum Genet*, 31: 173- 184.
- Briat J.F. and Lebrun M., 1999.** Plant responses to metal toxicity. *C. R. Academy Science*, III 322: 43-54.
- Brown D.H., 1984.** Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring., *Dyer A.F., Duckett* 101.
- Bruins M.R., Kapil S., Oehme F. W., 2000.** Microbial resistance to metals in environment. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 45: 198-207.
- Carballeira A., Lyopez J., Vyazquez M.D., 1999.** Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44: 12-24.
- Chandra RK 1984.** Excessive intake of zinc impairs immune responses *JAMA*, 252(11):1443-6.
- Chung L. K., Gupta V. K., Sawhney S. K., 1992.** Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry*, 31: 395-400.
- Colangelo E.P., Guerinot M.L., 2006.** Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:322–330.
- Delhaize e., gruber b.D., pittman J.K., White R.G., Leung h., Miao Y., Jiang I., Ryan P.R., Richardson A.E., 2007.** A role for the AtMTP11gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *Plant J.*, 51: 198-210.

- DiDonato R.J. Jr., Roberts L.A., Sanderson T., Eisley R.B., Walker E.L., 2004.** *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes, *The Plant Journal*, 403-414.
- Dong J., Wu F., Zhang G., 2006.** Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicum esculentum*). *Chemosphere* 64. 1659–1666.
- Eckhardt, Mas Marques, Buckhout, 2001.** “Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants”, *Plant Molecular Biology*, Volume 45, Number 4 / March.
- Eshed Y., Zamir D., 1995.** Introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield associated QTL. *Genetics*, 141: 1147-1162.
- Grandillo S., Ku H.M., Tanksley SD., 1999.** Identifying loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 953-951.
- Gravot A. et al., 2004.** AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett.* 561, pp22-28
- Grotz N., Guerinot ML., 2006.** Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Dartmouth College, Biological Sciences*, 304 Gilman, 03755, Hanover, NH, USA.
- Grusak M.A., Della Penna D., 1999.** Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:133–61.
- Grusak M.A., 1999.** Genomics-assisted plant improvement to benefit human nutrition and health. *Trends Plant Sc*, i 4, 164-166.
- Guerinot M.L., 2000.** The ZIP family of metal transporter. *Biochim Biophys Acta*, 1465, 190-198.
- Guerinot M.L., Salt, 2001.** Fortified Foods and Phytoremediation. Two Sides of the Same Coin. *Plant Phys.*, 125, 164-167
- Gur A., Zamir D., 2004.** Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *Plos Biology*, 2: 1610-1615.
- Haanstra J.P.W., Wye C., Verbakel H., Meijer-Dekens F., Van den Berg P., Odinet P., 1999.** An integraded high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicum esculentum* x *L.pennelli* F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 254-271.
- Hall J.L., Williams L.E., 2003.** “Transition metal transporters in plant. *Journal of experimental botany*, vol 54, n. 393, pg 2601-2613.
- Hanikenne M., Kramer U., Demoulin V., Baurain D., 2005.** A Comparative Inventory of Metal Transporters in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the Red Alga *Cyanidioschizon merolae*1[w] 446, *Plant Physiol.*, Vol. 137.
- Hansen T.H., Laursen K.H., Persson D.P., Pedas P., Husted S., Schjoerring J., 2009.** Micro-scaled high-throughput digestion of plant tissue samples for multi-

elemental analysis, *Plant Methods*, 1-11.

Holleman A.F., Wiberg E., 1985. *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin, 868.

Hussain D., haydon M.J., Wang Y., Wong E., Sherson S.M., Young J., camakaris J., Harper J.F., Cobbet C.S., 2004. P-type ATPase heavy metal transporter with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell* , 16: 1.327-1.339.

Kalloo G., 1991. Genetic Improvement of Tomato. Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14. *Sprigber- Verlag*, Berlin.

Knapp S., 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2001-2022.

Kobae Y., Uemura T., Sato M.H., Ohnishi M., Mimura T., Nakagawa T., Maeshima M., 2004. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol*, 45:1749-1758.

Larry R., Joanne L., 2007. Genetic resources of tomato. Genetic improvement of solanaceous crops. Vol. 2.

Lee K.R., Kuzukue N., Han J.S., Park J.H., Chang E.Y., Baek E.J., Chang J.S., Friedman M., 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit thr growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2832-2839.

Leita L., Contin M., Maggioni A., 1991. Distribution of cadmium and induced cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 77: 139-147.

Lorenzetti F., Falcinelli M., Veronesi F., 1994. Miglioramento genetico delle piante agrarie. *Edagricole*, Bologna.

Marchionni M., 1999. Inquinamento del suolo da metalli pesanti: effetti sulle piante. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.

Masojc P., 2002. The application of molecular markers in the process of selection. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7(2A): 499-509.

Mill R.F., Francini A., Ferreira da Rocha P.S., Baccarini p.J., Aylett M., Krijger G.C., Williams L.E., 2005. The plant P_{1B} – type ATPase AtHMA4 transports Zn and cd and plays a role in ndetoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS let*, 579: 783-791.

Moral R., Gomez I., Navarro Pedreno J., Maitax J., 1994. Effects of cadmium on nutrient distribution, yeild, and growth of tomato grown in soilness culture. *Journal Plant Nutrition*, 17: 953-962.

Newsome D.A., Swartz M., Leone N.C., Elston R.C., Miller E., 1988. Oral zinc in macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 106(2):192-8.

Obata H., Umebayashi M., 1993. Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. *Plant soil*, 155/156: 533-536.

Okland R.H., Steinnes E., Okland T., 1997. Element concentration in the boreal forest moss *Hylocomium splendens*: variation due to segment size, branching pattern and pigmentation. *Journal of Byology* , 19: 671- 684.

- Paleman J.D., Van der Voort JR., 2003.** Breeding by design. *Trends in Plant Science*, 8: 330-334.
- Patterson W.P., Winkelmann M., Perry M.C., 1985.** Zinc-induced copper deficiency: megamineral sideroblastic anemia, *Ann. Intern. Med.*, 103(3): 385-6.
- Peiter E., Montanini B., Gobert A., Pedas P., Husted S., Maathuis F.J., Blaudez d., Chalot m., Sanders d., 2007.** A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 104,8.532- 8.537.
- Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs S.D., Letham D.L., Lasat M.M., Garvin D.F., Eide D., Kochian LV., 2000.** The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 97:4956-4960.
- Peterson D.G., James Price H., Spencer Johnston J., Stack S.M., 1996.** DNA content of heterochromatin and euchromatin in tomato (*Lycopersicum esculentum*) pachytene chromosomes. *Genome*, 39: 77-82.
- Pilon M., Cohu C. M., Ravet K. Abdel-Ghany S.E. and Gaymard F., 2009.** *Current opinion in Plant Biology*, 12: 347-357.
- Puig S., Pennarubia L., 2009.** Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants, *Current opinion in Plant Biology*, 12: 299-306.
- Riffardi R., Levi-Minzi R., 1989.** Il controllo degli inquinanti in agricoltura. Gli inquinanti organici. *Chimica del suolo*, Patron Editore.
- Salt D. E., Baxter I., Lahner B., 2008.** Ionomics and the Study of the Plant Ionome. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 709-733.
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I., 1995a.** Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13: 468-473.
- Salt D.E., Prince R.C., Pickering I.J., Raskin I., 1995b.** Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 10: 1427-1433.
- Sanseverino W., Roma G., De Simone M., Faino L., Melito S., Stupka E., Frusciante L., Ercolano M.R., (2009).** PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Research*, 1-8 doi: 10.1093
- Siedlecka A., 1995.** Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum* , Polonie 64:265-272.
- Tanksley S.D., 2004.** The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *The Plant Cell*, 16: 181-189.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., De Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J. C., Miller L., Paterson A. H., Pineda O., Riider M.S., Wing R.A., Wu W., Young N. D. 1992.** High density molecular linkage maps of the tomato and potato genom. *Genetics* , 132: 1141-1160.
- Taylor I.B., 1986.** Biosystematics of the tomato. J.G. Atherton & j. Rudich (Editors). *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall. London.

- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I., 2000.** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:4991-4996.
- Totley S., Waldron K.J., Firbank S.J., reale B., Bessant C., Sato K., Cheek T.R., Gray J., banfield M.J., Dannison C., et al., 2008.** Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc- binding. *Nature*, 455: 1138-1142.
- Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S., 2002.** Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *The Plant Cell*, 14: 1441–1456.
- Verbruggen N., Hermans C., Schat H., 2009.** Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biolog*, 364-372.
- Wainwright S.J., Woolhouse H.W., 1975.** Physiological mechanism of heavy metals tolerance in plants. *British Ecological Society Symposium*, 15: 231-258.
- Wang Y., Tang X., Cheng Z., Mueller L., Giovannoni J., Tanksley S.D., 2006.** Euchromatin and pericentromeric heterochromatin: comparative composition in the tomato genome. *Genetics*, 172: 2529–2540.
- Waters B.M., Heng-Hsuan Chu, DiDonato R.J., Louis A. Roberts, Robynn Bosler Eisley, Brett Lahner, David E. Salt, Elsbeth L. Walker, 2006.** Mutation in Arabidopsis Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 Reveal Their Roles in Metal Ion Homeostasis and Loading of Metal Ions in Seeds. *Plant Physiology*, vol. 141, 1446-1458.
- Welch RM, Graham RD, 2004.** Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bo.*, 55. 353-364.
- Williams L.E., Mills R.F., 2005.** P1b- ATPases-an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science*, vol. 10 No. 10, 491-502.
- Zenk M. H., 1996.** Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene*, 179: 21-30.

APPENDICE

Elenco delle pubblicazioni.

Poster: **De Biasi M.G., Salluzzo A., Lippo S.M., Chiaiese P., Filippone E. (2008).** Towards Ionomics Map of Tomato Plants For Human Health. *Proceedings of XLVII° Congresso S.I.F.V.*, PVI04, pag. 66.

Poster: **Trombetta C., Lippo S.M., Ruotolo G., Salluzzo A., De Biasi M.G., Chiaiese P., Filippone E. (2008).** Ion uptake and *ysl1* gene identification in tomato. *Proceedings of 52nd Italian Society of Agriculture Genetics Annual Congress.*

Poster: **Trombetta C., Lippo S.M., Ruotolo G., Salluzzo A., Nardi E., De Biasi M.G., Chiaiese P., Filippone E. (2008).** Analisi ionica ed identificazione del gene *ysl1* in pomodoro (*Solanum lycopersicum*). *Giornate scientifiche, Area tematica-Biotecnologie, Genetica*, Portici.

Poster: **De Biasi M.G., Salluzzo A., Lippo S.M., Chiaiese P., Filippone E. (2009).** Heavy metals homeostasis in *Solanum lycopersicum* cv. M82 and *Solanum lycopersicum* X *Solanum pennellii* IL 6-4. *Società di Biologia Vegetale- I Annual Congress*, Verona 30th June-02nd, July.

Poster: **De Biasi M.G., Salluzzo A., Lippo S.M., Palomba F., Ruotolo G., Chiaiese P., Filippone E. (2009).** Tomato ionomics approach for food fortification and safety. *Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress*, Torino, Italy, 16/19 September.

COPIA DELLE PUBBLICAZIONI

TOWARDS IONOMIC MAP OF TOMATO PLANTS FOR HUMAN HEALTH.

DE BIASI MARGHERITA-GABRIELLA¹, SALLUZZO ANTONIO², LIPPO SILVIA¹, CHIAIESE PASQUALE¹, FILIPPONE EDGARDO¹.

¹ Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnological Science, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (NA) Italy;

² ENEA (Italian National Agency for New Technology Energy and the Environment) Portici Research Center, Via Vecchio Macello - 80055 Portici (NA) Italy.

Ionic, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS), Solanum lycopersicon, heavy metal, healthness.

The use of wild relatives in food crops breeding is leading to obtain new traits, generated by the new genome combination. However, these procedures foreseen a limited control on traits not linked with the ones submitted to selection. Some of those may deal with enhanced heavy metals or reduced micronutrients accumulating from the soil, thus inferring on the healthness of the food. In the frame of the project GenoPom (MIUR), we have started a research project on tomato commercial varieties and some introgression lines obtained after interspecific crosses between *Solanum lycopersicon* M82 and *Solanum pennellii*, in order to generate ionomic maps, dealing with heavy metals adsorption, translocation and accumulation into plant tissues and organs. Tomato plants were grown in hydroponic culture under controlled environmental conditions. Some plants were cultivated in presence of non-toxic concentration of Cd (10 µM), Pb (3 µM) and Zn (100 µM). After one month, plants control and treated were harvested: roots, stems, and leaves were collected for the ionomic analysis. Element concentrations were performed by ICP-MS and results are reported and discussed.

Proceedings of the 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress
Padova, Italy – 14/17 September, 2008

ISBN 978-88-900622-8-5

Poster Abstract – C.33

ION UPTAKE AND YSL1 GENE IDENTIFICATION IN TOMATO

TROMBETTA C.*, LIPPO S.M.*, RUOTOLO G.*, SALLUZZO A.***, DE BIASI M.G.*,

CHIAIESE P.*, FILIPPONE E.*

*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of

Biotechnology, University of Naples “Federico II”, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

**) Department Environment, Global Change and Sustainable Development, ENEA - Portici -

Research Centre, Via Vecchio Macello, 80055 Portici (Italy)

Ion uptake, Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *Solanum lycopersicum*, ysl1

Tomato breeder are using wild tomato relatives, even non-cross compatibles ones, in order to

obtain cultivars with highly commercial values bearing new traits. However, the introgression of a wild genome into the cultivated one produces a new gene combinations that may lead to the expression of undeliverable traits, perhaps not so easy to recognise; even more, phenotypic variations may escape during the selection procedure when minor genes or non-abnormal phenotypes are involved. In the frame of the “GenoPom” project funded by MIUR, we have focused our interest on the alteration of heavy metals uptake from the soil and their loading into edible organs in commercial lines coming from *Solanum* interspecific crosses. Our final aim is to put together data coming from ion homeostasis and gene expression analyses, thus obtaining a ionomic map of tomato. To pursue our goal, we have started to study the cv M82 of *Solanum lycopersicum*, the wild relative *Solanum pennelli* and their introgression lines IL. Regarding the experiments on ion homeostasis, *S. lycopersicon* M82 and the introgression line IL 6-4-2 were grown in hydroponics under controlled environmental conditions. Twenty day-old plants were left to grow for 10 days in the presence of non-toxic concentration of Cd (10 µM), Pb (3 µM), Zn (100 µM) given separately or combined. Control and treated roots and leaves were then harvested and stored at -80°C for ionic and gene expression analyses. Ions analysis of *Solanum lycopersicum* M82 and IL 6-4 showed that traits correlated to ionic homeostasis is significantly modified in response

to all metals and to the genotype. The analysis of ions data, obtained by ICP-MS, give a pictures of the different responses performed both to different stress and to combined stress, probably correlated to the up-regulation and/or down regulation of metal uptake proteins. Performed experiments demonstrate that the introgression of the wild genome into the cultivated one produces a new phenotype, perhaps due to

the expression of traits linked to uptake, translocation and accumulation of useful and/or toxic metal into plant tissues and organs. Regarding the functional genomics approach for gaining insight into gene networks involved in mineral-ion accumulation in tomato plants, in literature has been reported that at least 25 major family genes are involved for metal homeostasis in plants. Among them, the genes *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt*, *zrt* have been already studied at least in the plant species *Arabidopsis thaliana*, *A. halleri* and *Thlaspi caerulescens*. So far, no such genes have been reported to be cloned in *Solanum* species. We have focused our study on the genes *ysl1*, *znt1* and *mtp1* responsible for uptake, translocation and accumulation of metal such as zinc, cadmium, and iron into plant compartment. For all of them, consensus sequences from nucleotide multialignment have been obtained. Then, each of those were blasted in a *Solanum* EST collection databank and an assembled UniGene

ION UPTAKE AND *YSL1* GENE IDENTIFICATION IN TOMATO

TROMBETTA C.*, LIPPO S.M.*, RUOTOLO G.*, SALLUZZO A.***, DE BIASI M.G.*,

CHIAIESE P.*, FILIPPONE E.*

*) Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnology, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

**) Department Environment, Global Change and Sustainable Development, ENEA - Portici -

Research Centre, Via Vecchio Macello, 80055 Portici (Italy)

Una delle metodologie per il miglioramento genetico delle piante coltivate è l'incrocio tra varietà coltivate e specie selvatiche. Ciò comporta l'introggressione nella specie coltivata oltre di caratteri richiesti dal mercato alimentare anche di caratteri non desiderabili, tra cui l'assorbimento, la traslocazione e l'accumulo di metalli come il piombo ed il cadmio. Tale rischio deriva anche da una bassa specificità dei trasportatori di membrana deputati all'assorbimento di tali metalli, come il cadmio e lo zinco che possono essere traslocati all'interno delle radici dalla stessa proteina.

Nell'ambito del progetto "GenoPom", finanziato dal MIUR, il nostro obiettivo finale è quello di ottenere una mappa ionomica del pomodoro, ottenuta da analisi sull'omeostasi ionica e sull'espressione genica.

Il materiale vegetale utilizzato proviene da tre diverse specie: la cv M82 di *Solanum lycopersicum*, il parentale selvatico *Solanum pennelli* e le loro linee di introgressione IL. Riguardo gli esperimenti sull'omeostasi ionica, *S. lycopersicum* M82 e la linea di introgressione IL6-4 sono state coltivate in idroponica in condizioni controllate in presenza di concentrazioni non letali di Cd (10 µM), Pb (3 µM), Zn (100µM) date separatamente o in combinazione.

Le analisi ioniche di *Solanum lycopersicum* M82 e IL 6-4 mostrano che le caratteristiche correlate all'omeostasi ionica sono significativamente modificate in risposta a tutti i metalli e al genotipo. Le analisi dei dati sugli ioni, ottenuti con ICP-MS, mostrano differenti risposte in caso di stress singolo o multiplo.

Per quanto riguarda l'approccio di genomica funzionale, studi bibliografici preliminari hanno permesso di individuare 25 geni maggiormente coinvolti nell'omeostasi dei metalli in pianta; di questi, 5 geni *ysl*, *hma*, *mtp*, *znt*, *zrt*, risultavano essere presenti in almeno due specie differenti, generalmente *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri* o *Thlaspi caerulescens* ma nessuno ancora clonato nel genere *Solanum*.

Analisi bioinformatiche hanno permesso di individuare diverse sequenze EST di pomodoro che, assemblate in UniGene rappresentano cluster che teoricamente corrispondono ad un singolo gene, risultano altamente omologhe a quelle da noi ricercate per i 3 geni *ysl*, *znt* e *mtp*.

Al fine di verificarne l'effettiva presenza, abbiamo disegnato coppie di primer su ciascun UniGene individuato, e in seguito clonato e sequenziato i frammenti ottenuti.

La sequenza nucleotidica di *ysl1* da noi ottenuta è stata confrontata con tutte le sequenze nucleotidiche presenti nella banca dati ed è stata riscontrata un'identità del 92% con la sequenza codificante completa del gene *ysl1* di tabacco (*Nicotiana tabacum*). La putativa sequenza nucleotidica codificante è stata tradotta *in silico* e confrontata con le sequenze amminoacidiche presenti in banca dati: l'identità risultante è stata del 89% con la sequenza amminoacidica della proteina YSL di tabacco (*Nicotiana tabacum*).

HEAVY METALS HOMEOSTASIS IN SOLANUM LYCOPERSICUM CV. M82 AND S. LYCOPERSICUM X S. PENNELLII IL 6-4.

DE BIASI MARGHERITA-GABRIELLA¹, SALLUZZO ANTONIO², LIPPO SILVIA¹, CHIAIESE PASQUALE¹, FILIPPONE EDGARDO¹

¹ Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, School of Biotechnological Science, University of Naples "Federico II", Via Università 100, 80055 Portici (NA) Italy. – ² ENEA (Italian National Agency for New Technology Energy and the Environment) Portici Research Center, Via Vecchio Macello - 80055 Portici (NA) Italy.

Keywords: Ionomic, Solanum lycopersicum, Introgression Line, ICP-MS, heavy metals accumulation, food safety.

Genetic linkage map was constructed for *Solanum lycopersicum* and currently there are several molecular maps based on crosses between the cultivated and various wild tomato species. However, until now, little information is available on QTL for ions accumulation in tomato. Moreover, as our knowledge, effects of new gene combinations in introgressed lines on ions uptake related to food safety have not been extensively studied. We are studying two tomato genotypes: *Solanum lycopersicum* cv M82 and IL 6-4. The latter is an introgression line of the tomato wild-relative species *S. pennellii* in the cv M82; on the basis of bioinformatic approach, genes involved in ions uptake, translocation and accumulation should have introgressed. All plants were grown in hydroponic in the presence of non-toxic concentration of Cd (10 microM), Pb (3 µM) and Zn (100 µM) given separately or combined. The ionome modifications induced by treatments were revealed by ICP-MS performed on tomato leaves. The analysis of all leaves showed that IL 6-4 accumulated more ions than M82 and that both excluded toxic metals, at least in the presence of combined stress. This project was granted by GenoPom MIUR program.

Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress
Torino, Italy – 16/19 September, 2009

ISBN 978-88-900622-9-2

Poster Abstract – 1.12

TOMATO IONOMIC APPROACH FOR FOOD FORTIFICATION AND SAFETY

DE BIASI M.G.*, SALLUZZO A.**, LIPPO S.M.*, PALOMBA F.*, RUOTOLO G.*,
CHIAIESE P.*, FILIPPONE E.*

*) University of Naples "Federico II", School of Biotechnology, Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Production Sciences, Via Università 100, 80055 Portici (NA), Italy ***) ENEA Italian national Agency for New Technologies, Energy and the Environment, Portici - Research Centre, Via Vecchio Macello, 80055 Portici (NA), Italy

Ionic, *Solanum lycopersicum*, Introgression Lines, food fortification, food safety

Food fortification is an issue of paramount importance for people living both in developed and in developing countries. Among substances listed as "nutriceuticals", essential minerals have been recognised for their involvement in several healthy issues, involving all ages. In this frame, food plants are playing a pivotal role since their capability to compartmentalise ions and protein-metal complexes in edible organs. Conversely, the accumulation of high metal levels in those organs may lead to safety problems. In the recent years, thanks to the availability of new and improved analytical apparatus in both ionic and genomic/transcriptomics areas, it has become feasible to couple data coming from plant physiology and genetics. Ionomics is the discipline that studies the cross-analysis of both data sets. Our group, in the frame of GenoPom project granted by MiUR, is interested to study the ionomics of tomatoes cultivars derived by breeding programmes in which wild relatives have been used to transfer several useful traits, such as resistance to biotic or abiotic stresses, fruit composition and texture, etc. The introgression of the wild genome into the cultivated one produces new gene combinations. They might lead to the expression of some traits, such as increased or reduced adsorption of some metals and their exclusion or loading into edible organs, thus strongly involving the nutritional food value. Our final goal is to put together data coming from ions homeostasis and gene expression analyses, thus obtaining an ionic tomato map related to ions absorption, translocation and accumulation in various plant organs, fruits included. To follow our hypothesis, we are studying the ionome of *Solanum lycopersicum* cv. M82 along with 76 Introgression Lines (ILs) produced by interspecific crosses between this cultivar and the wild species *S. pennellii*. These ILs are homozygous for small portions of the wild species genome introgressed into the domesticated M82 one. They are used as a useful tool for mapping QTL associated with many traits of interest. It is worthy to note that, until now, little information is available on QTL for ions accumulation in tomato. Moreover, as our knowledge, effects of new gene combinations in introgressed lines on ions uptake related to food safety have not been extensively studied. In this presentation we show results coming from the ionome analysis, carried out on *S. lycopersicum* M82 and several ILs. Plants were grown in pots in a greenhouse and watered with deionised water. Thirty day-old

plants were left to grow for 15 days in the presence of non-toxic concentration of Cd, Pb, As, Cr and Zn given combined. Leaves of all plants were then harvested and stored at -80°C for ionome and gene expression analyses. Preliminary results of ionome analysis of *S. lycopersicum* M82 and several ILs, carried out using an ICP-MS, showed that traits correlated to toxic metals and micronutrients accumulation in apical leaves were significantly